

Antitumorale Eigenschaften
monoklonaler Antikörper
gegen experimentelle Gliome
in vitro und in vivo

Ursula Mellert

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554617_0068

Aus dem Institut für Tierpathologie der
Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Antitumorale Eigenschaften monoklonaler Antikörper gegen
experimentelle Gliome in vitro und in vivo

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ursula Mellert
aus Saarbrücken

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Meinen Eltern

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. EINLEITUNG	4
B. LITERATURÜBERSICHT	6
I. Monoklonale Antikörper	6
II. Diagnose von Tumoren mittels monoklonaler Antikörper	8
III. Antitumorale Eigenschaften nativer monoklonaler Antikörper in vitro	9
IV. Konjugation zytotoxischer Substanzen mit monoklonalen Antikörpern	10
V. In vivo-Wachstumsdepression von Tumoren	14
VI. Heterogenität von Tumoren	17
C. PROBLEMSTELLUNG	19
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	20
I. Material und Methoden	20
1. Versuchstiere	20
2. Zellkulturen	20
2.1. Permanente Gliomzelllinie	20
2.2. Myelomzelllinie	21
2.3. Hybridomzelllinie	22

2.4. Mäuseperitonealzellen	22
2.5. Mausosteosarkomlinie	23
3. Gewinnung von Ascitesflüssigkeit	24
4. Ammoniumsulfatpräzipitation zur An- reicherung von Immunglobulinen	24
5. Auftauen von Zellen	25
6. Indirekte Immunperoxidasefärbung	26
7. Konjugation von Ricin-A mit monoklonalem Antikörper	27
8. Depression der Tumorzellproliferation	28
9. ³ H-Thymidin-Einbau der Gliomzellen unter Einfluß des monoklonalen Antikörpers 14AC1	29
10. Tumor-Wachstumsdepression in vivo	30
11. Beeinflussung der Bildung von Organmetastasen nach i.v. Injektion von 14AC1-behandelten Gliomzellen	32
II. Ergebnisse	33
1. Bindungsfähigkeit von nativem und an Ricin-A gekoppeltem monoklonalen Antikörper 14 AC1	33
2. Depression der Tumorzellproliferation in vitro durch den monoklonalen Antikörper 14AC1 und 14AC1-Ricin-Immunotoxin	35

3. ^3H -Thymidin-Einbau der Gliomzellen unter Einfluß des monoklonalen Antikörpers 14AC1	37
4. Tumor-Wachstumsdepression in vivo	38
5. Beeinflussung der Metastasenbildung nach i.v. Injektion von 14AC1-behandelten Gliomzellen	46
E. DISKUSSION	50
F. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	60
G. LITERATURVERZEICHNIS	64

A. EINLEITUNG

Die Möglichkeit, monoklonale Antikörper gegen unterschiedliche antigene Strukturen zu produzieren (Köhler und Milstein, 1975), hat auch in der Tumorummunologie Anwendung gefunden. Über die Existenz von tumor-assoziierten Antigenen wurde von mehreren Autoren berichtet (Klein, 1966; Hellström et al., 1969; Old und Boyse, 1969; Baker und Taub, 1973; Warnatz, 1975; Herbermann, 1977; Ghose et al., 1981), wobei von verschiedenen Untersuchern gezeigt werden konnte, daß auch Gehirntumoren gliom-assoziierte Antigene (GAA) exprimieren (Kornblith et al., 1974; Wahlström et al., 1974; Wikstrand et al., 1977; Cravioto, 1978; Stavrou et al., 1978a,b, 1980; Bilzer et al., 1982). Monoklonale Antikörper, die gegen GAA experimenteller wie auch spontaner Gehirntumoren gerichtet waren, wurden bereits für die Darstellung dieser Tumoren mittels externer Szintigraphie verwendet (Ballou et al., 1979; Mach et al., 1981; Epenetos et al., 1982a,c; Hedin et al., 1982; Pimm et al., 1982; Scheinberg et al., 1982; Weinstein et al., 1982, 1983; Baldwin et al., 1983; Bourdon et al., 1983; Herlyn et al., 1983; Phillips et al., 1983; Strand et al., 1984; Stavrou et al., 1985a,b). Eine weitere interessante Anwendungsmöglichkeit dieser gliomspezifischen monoklonalen Antikörpern bestünde - entweder als native Antikörpermoleküle oder als Trägermole-



küle zytotoxischer Substanzen - in ihrer klinischen Anwendung für eine Tumorthherapie. Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigte, daß monoklonale Antikörper antitumorale Eigenschaften besitzen, und zwar sowohl nativ (Herlyn et al., 1980; Kennel et al., 1983; North und Dean, 1983; Dippold et al., 1984; Hellström et al., 1985), wie auch an radioaktive Substanzen (Ghose und Glucu, 1974; Zalcborg et al., 1984), Chemotherapeutika (Kanellos et al., 1985; Rowland et al., 1985; Berners-Price et al., 1986) oder Toxine (Tsukazaki et al., 1985; Embleton et al., 1986; Press, 1986) gebunden. Insbesondere die Anwendung von Immunotoxinen (Vitetta et al., 1983a,b) würde aufgrund ihrer hohen Spezifität sowie selektiven Zytotoxizität eine Möglichkeit darstellen, Gliome therapeutisch anzugehen, die entweder inoperabel sind oder durch Strahlen- oder Chemotherapie nicht beeinflußt werden können.

B. LITERATURÜBERSICHT

I. Monoklonale Antikörper

Der erste Bericht über die Produktion von monoklonalen Antikörpern stammt von Köhler und Milstein (1975), denen es gelang, durch Verschmelzung von Myelomzellen mit Milzzellen von immunisierten Spendertieren Hybridzellen herzustellen, die permanent Antikörper sezernieren. Die Technik, mittels derer es möglich ist, Antikörper höchster Spezifität und Reinheit zu produzieren, hat auch in der Tumorimmunologie großes Interesse geweckt. Das Prinzip der Produktion monoklonaler Antikörper besteht darin, B-Lymphozyten von immunisierten Spendern durch Fusion mit Myelomzellen zu immortalisieren und somit eine Produktion von Antikörpern gleichbleibender Spezifität und Reinheit zu ermöglichen. Damit können die Nachteile, die bei der Verwendung polyklonaler Antikörper auftreten, wie z.B. unterschiedliche Spezifität, Affinität, Immunglobulinklassen und -subklassen, durch den Einsatz monoklonaler Antikörper weitestgehend ausgeschaltet werden (Thomas, 1984).

Da die Existenz von spezifischen Oberflächenantigenen bei Tumorzellen als gesichert gilt (Klein, 1966; Hellström et al., 1969, Old und Boyse, 1969; Baker und Taub, 1973; Warnatz, 1975; Herbermann, 1977; Ghose et al., 1981), können

auch Tumorzellen beziehungsweise die entsprechenden tumorspezifischen Antigene zur Immunisierung und Produktion monoklonaler Antikörper verwendet werden. Es konnten somit monoklonale Antikörper gegen unterschiedlichste Tumoren beim Menschen als auch beim Tier etabliert werden, wie z.B. Melanome (Koprowski et al., 1978; Herlyn et al., 1979, 1980; Yeh et al., 1979; Dippold et al., 1980, 1984; Ghose et al., 1981; Mitchell et al., 1981; Seeger et al., 1981; Carrel et al., 1982; Garrigues et al., 1982; Libert et al., 1983; Vollmers et al., 1983; Lindmo et al., 1984; Hellström et al., 1985; Schroff et al., 1985), Lungenkarzinom (Minna et al., 1981), Kolorektalkarzinom (Herlyn et al., 1979, 1980; Gilliland et al., 1980, Kanellos et al., 1985), Lymphom (Nadler et al., 1980), Osteosarkom (Embleton et al., 1983, 1986; Feit et al., 1983; Garnett et al., 1983; Gallego et al., 1984), Gliome (Schnegg et al., 1981; Seeger et al., 1981; Sikora et al., 1981, 1982; Carrel et al., 1982; Fabre et al., 1982; Wikstrand et al., 1982; Bourdon et al., 1983; de Muralt et al., 1983), Neuroblastome (Eisenbart et al., 1979; Kennett et al., 1979, 1980; Seeger et al., 1981; Carrel et al., 1982), Ovarialkarzinom (Burstein et al., 1977; Canevari et al., 1985), Retinoblastom (Merriam et al., 1984), Myelom der Maus (Galfré et al., 1979; Fazekas et al., 1980), Glioblastom der Ratte (Stavrou et al., 1982),

Fibrosarkom der Ratte (North et al., 1982, 1983), Hepatokarzinom beim Meerschweinchen (Bernhard et al., 1983) und Leukämie der Maus (Bernstein et al., 1980; Masuho und Hara, 1980; Blythman et al., 1981; Kishida et al., 1983). Die Einsatzmöglichkeiten der monoklonalen Antikörper erstrecken sich sowohl auf die Diagnose von Tumoren als auch auf ihre z.T. antitumoralen Eigenschaften in vitro und in vivo.

II. Diagnose von Tumoren mittels monoklonaler Antikörper

Für die in vitro-Diagnostik von Tumoren können vor allem in der Immunhistochemie monoklonale Antikörper verwendet werden. So konnten Kennett et al. (1980) mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers an Gefrierschnitten Neuroblastomzellen nachweisen, die das Antigen PI 153/3 exprimierten. Auch Arklie et al. (1981), Mattes et al. (1983) und Weij et al. (1983) konnten mittels indirekter Immunperoxidasefärbung die Bindung monoklonaler Antikörper an Gefrierschnitten darstellen. Für die experimentelle in vivo-Diagnose von Tumoren wurden monoklonale Antikörper mit radioaktiven Substanzen markiert und somit eine Darstellung mittels externer Szintigraphie erreicht. Dafür wurde von einigen Autoren ¹³¹Jod (Ballou et al., 1979; Mach et al., 1981; Bourdon et al., 1983; Phillips et al., 1983; Stavrou et al.,

1985a,b) verwendet, von anderen ¹²⁵Jod (Epenetos et al., 1982c) oder ¹¹¹Indium (Scheinberg et al., 1982). Auch die klinische Anwendung von radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern zeigte Erfolge. Farrands et al. (1982) konnten eine Anreicherung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein Kolorektalkarzinom bei 10 von 11 Patienten nachweisen. Phillips et al. (1983) gelangen die in vivo-Darstellung eines Glioms mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers.

III. Antitumorale Eigenschaften nativer monoklonaler Antikörper in vitro

Über die antitumoralen Eigenschaften nativer monoklonaler Antikörper in vitro wurde von mehreren Autoren berichtet (Kennel et al., 1983; North and Dean, 1983). So konnten Bernstein et al. (1980) zeigen, daß monoklonale Antikörper gegen Mäuseleukämiezellen in der Lage sind, bei diesen eine Lysis zu bewirken. Auch Dippold et al. (1984) konnten bei menschlichen Melanomzellen durch Inkubation mit nativem monoklonalem Antikörper eine Wachstumsdepression in vitro hervorrufen. Dies konnte auch von Hellström et al. (1985) bestätigt werden. Dabei scheint die Immunglobulinklasse der Antikörpermoleküle von großer Bedeutung zu sein. In mehreren Arbeiten, bei denen die Wirksamkeit monoklonaler Antikörper

verschiedener Immunglobulinklassen und -subklassen verglichen wurde (Bernstein et al., 1980; Dippold et al., 1984; Hellström et al., 1985), zeigten die Immunglobuline der IgG_{2a}-Subklasse die stärksten antitumoralen Eigenschaften. Dies wurde mit der Fähigkeit von IgG_{2a}-Antikörpern, Komplement zu binden, in Zusammenhang gebracht (Stanworth und Turner, 1973).

IV. Konjugation zytotoxischer Substanzen mit monoklonalen Antikörpern

Eine Verstärkung der zytotoxischen Wirkung polyklonaler wie auch monoklonaler Antikörper konnte durch die Kopplung der Antikörpermoleküle an zytotoxische Substanzen, wie z.B. Medikamente (Ghose et al., 1972a,b, 1981; Burstein et al., 1977; Embleton et al., 1983; Garnett et al., 1983; Gallego et al., 1984; Kanellos et al., 1985; Rowland et al., 1985; Berners-Price et al., 1986), Pflanzengifte (Vitetta et al., 1983; Seon et al., 1984; Tsukazaki et al., 1985; Embleton et al., 1986; Press et al., 1986), Bakterientoxine (Moolten et al., 1976; Gilliland et al., 1980; Bernhard et al., 1983; Bumol et al., 1983; Villemez et al., 1984) oder radioaktive Isotope (Ghose et al., 1974; Zalcborg et al., 1984) erzielt werden. Die für die Kopplung verwendeten Substanzen sollten

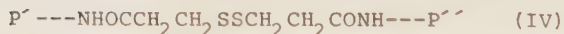
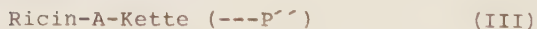
bestimmte Anforderungen erfüllen. So sollten sie nach der Kopplung an den Antikörper eine hohe Wirksamkeit mit wenig oder keinen Nebenwirkungen zeigen. Dabei sollte die zytotoxische Wirkung erst dann entfaltet werden, nachdem die gekoppelten Substanzen von dem monoklonalen Antikörper an die Oberfläche der Zielzelle verbracht worden sind und in diese eingeschleust wurden (Moolten et al., 1976). Auf Grund ihrer hohen Toxizität wurde in mehreren Arbeiten über die Verwendung von Pflanzentoxinen für die Kopplung berichtet (Gilliland et al., 1980; Krolick et al., 1980; Masuho und Hara, 1980; Youle und Neville, 1980; Jansen et al., 1982; Kishida et al., 1983; Vitetta et al., 1983; Merriam et al., 1984; Seon et al., 1984; Bjorn et al., 1985; Canevari et al., 1985; Embleton et al., 1986; Press et al., 1986). Untersuchungen von Eiklid et al. (1980) ergaben, daß ein Molekül eines Toxins wie Ricin in der Lage ist, eine Zielzelle zu töten und daß ca. 1 ng/ml Ricin genügen, um die Zellproteinsynthese in vitro zu hemmen. Die minimale Letaldosis des Ricins für Mäuse liegt bei 2,7 µg/kg, für Hunde bei 1,75 µg/kg (Fodstad et al., 1979).

Die am besten untersuchten Pflanzentoxine wie Ricin, Abrin und Modeccin haben einen gemeinsamen Aufbau. Sie bestehen aus zwei funktionell verschiedenen Polypeptidketten, einer A- (aktiv) und einer B- (bindend) Kette (Collier et al.,

1971; Drazin et al., 1971; Olsnes et al., 1973; Gilliland et al., 1980). Die A-Ketten katalysieren als Enzyme Reaktionen, die spezifische Komponenten der Proteinsynthese im Zytosol hemmen. Die A-Kette des Ricins hemmt z.B. die 60S-Ribosomen-untereinheit (Benson et al., 1975). Die B-Kette ist ein Glykoprotein, das sich an Galaktose enthaltende Glykoproteine und Glykolipide von Oberflächenmembranen bindet. Auch erleichtert sie der A-Kette den Eintritt in die Zelle (Jansen et al., 1982; Vitetta et al., 1983). Mit der Bindungskapazität des B-Stückes ist aber auch eine starke unspezifische Zytotoxizität verbunden (Blythman et al., 1981). Durch Austausch der B-Kette durch monoklonale Antikörper, kann dieser Effekt vermieden werden. Verschiedene Versuche zeigten, daß solche Konjugate ("Immunotoxine") sowohl in vitro als auch in vivo wirksam sind (Miyazaki et al., 1980; Raso et al., 1982; Vitetta et al., 1982).

Das Problem bei der Herstellung von Antikörper-Toxin-Konjugaten liegt darin, daß zwischen zwei unterschiedlichen Proteinen eine kovalente Bindung hergestellt werden soll, die in vitro als auch in vivo stabil bleiben muß. Durch die Entwicklung heterobifunktioneller Substanzen, wie z.B. N-succinimidyl-3(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) (Carlsson et al., 1978; Rector et al., 1978; Thorpe und Ross, 1982)

wurde es möglich, zytotoxische Substanzen ohne Verlust ihrer Zytotoxizität oder pharmakologischen Wirkung an monoklonale Antikörper zu koppeln. So beschrieben Carlsson et al. (1978) eine Methode, bei der eine Gruppe des einen Proteins spezifisch mit einer eingeschleusten Gruppe des anderen Proteins reagiert. Dies gelang ihm mit SPDP (I), einem heterobifunktionellem Reagenz, das in der Lage ist, bei Proteinen eine 2-pyridyl-Sulfidgruppe zu substituieren, indem es mit der Aminogruppe des Proteins reagiert (II). Da die A-Kette des Ricins eine freie Thiolgruppe besitzt (III), kann sie direkt mit dem 2-pyridyl-disulfid-substituierten Globulin reagieren, wodurch zwischen beiden Reagenten eine Disulfidbrücke entsteht (Thorpe und Ross, 1982).



V. In vivo Wachstumsdepression von Tumoren

Die Therapie von Tumoren mittels Antikörpern ist für die Tumorummunologie seit längerer Zeit von beträchtlichem Interesse (Motta et al., 1971). Unter gewissen Bedingungen können Antikörper gegen Tumoren das Wachstum und das Ausbreiten der Tumorzellen in vivo unterdrücken (Seto et al., 1983). Ein limitierender Faktor des Einsatzes von polyklonalen Antikörper für die Behandlung von Tumoren war bisher das Fehlen von Antikörpern in ausreichender Quantität und Aktivität sowie einer prädefinierten Spezifität (Bernstein et al., 1980). Mit Hilfe monoklonaler Antikörper können diese Schwierigkeiten nun weitestgehend umgangen werden. Nach North et al. (1982) müssen die Antikörper für die Therapie folgende Bedingungen erfüllen: (a) Sie sollten sich spezifisch an die Tumorzellen binden, (b) lange genug in der Blutbahn zirkulieren und (c) schnell genug in das extravaskuläre Gewebe penetrieren. Bernstein et al. (1980) konnten mit monoklonalen Antikörpern gegen ein Thymus-Differenzierungsantigen (Thy-1.1) erfolgreich leukämische Mäuse behandeln. Die passive Immunisierung resultierte dabei in hohen Titern zytotoxischer Antikörper im Serum und in einer Unterdrückung der Metastasenbildung. Zur Verstärkung der Wirkung monoklonaler Antikörper wurde zusätzlich exo-

genes Komplement verabreicht. Die Behandlung von humanen Kolorektalkarzinomen - nach der Transplantation in Nacktmäuse - mit monoklonalen Antikörpern hatte eine geringere Tumorzinzidenz, eine längere Latenzperiode und ein geringeres Tumorzvolumen im Vergleich zu den Kontrolltieren zur Folge (Herlyn et al. 1980). Ferner konnten Herlyn et al. (1983) mit syngenesischen monoklonalen Antikörpern gegen Moloney-Sarkomzellen die Überlebensrate der tumortragenden Mäuse signifikant erhöhen, jedoch nur bei frühzeitiger Behandlung. Eine Therapie von Mäusen mit größeren Tumoren hatte keine wesentliche Lebensverlängerung zur Folge.

Die Immunglobulinklasse des Antikörpers scheint auch bei in vivo-Therapie eine wesentliche Rolle zu spielen. Seto et al. (1983) fanden mit einem serologischen Neutralisationstest, daß besonders IgG_{2a}-Antikörper eine signifikante Tumorzvumsdepression bewirken, während IgG_{2b} und IgG₁ nur schwach wirksam waren. IgG₃, IgM und IgA hatten keinen Effekt auf das Tumorzvumwachstum in vivo. Auch beim ADCC (Antibody dependent cell cytotoxicity test) war IgG_{2a} am stärksten wirksam (Greenberg et al., 1979). Bernstein und Nowinski (1982) konnten nur mit monoklonalen IgG_{2a}-Antikörpern gegen eine T-Zell-Leukämie bei Mäusen einen signifikanten antitumoralen Effekt in vivo feststellen, während IgM keinen erkennbaren Einfluß auf das Tumorzvumwachstum hatte. Eine

Wachstumsdepression einer großen Anzahl von Tumorzellen durch systemische Verabreichung eines monoklonalen IgG_{2a} - Antikörpers fanden auch Adams et al. (1984). Histologisch zeigte sich dabei eine Zellzerstörung und ein vermehrtes Auftreten von Makrophagen im Tumor. North und Dean (1983) verwendeten einen monoklonalen IgG_{2a}-Antikörper zur Verhinderung der Metastasierung eines Rattenfibrosarkoms. Ähnliche Erfolge erzielten Vollmers und Birchmeier (1983) bei einem Maus- Bl6-Melanom.

Nadler et al. (1980) konnten mit monoklonalen Antikörpern gegen ein humanes lymphomassoziiertes Antigen eine Abnahme der zirkulierenden Lymphomzellen in der Blutbahn bei einem Patienten bewirken. Sie führten das auf eine komplementvermittelte Zelllysis zurück, während Seto et al. (1983) und Herlyn et al. (1980) den antitumoralen Effekt der monoklonalen Antikörper auf eine Makrophagen-vermittelte Zelllysis zurückführten. Dippold et al. (1984) konnten in vitro eine Wachstumsverzögerung von menschlichen Melanomzellen ohne Einwirkung von Effektorzellen oder Komplement feststellen.

VI. Heterogenität von Tumoren

Die Tatsache, daß bei den meisten Experimenten einer Therapie von Tumortransplantaten mit monoklonalen Antikörpern gegen tumorassoziierten Antigenen das Tumorwachstum nur reduziert, aber nicht vollständig inhibiert werden konnte, läßt vermuten, daß in den Tumoren auch Zellen vorhanden sein müssen, die offensichtlich von dem jeweils verwendeten monoklonalen Antikörper nicht erkannt werden können und somit der Therapie entgehen (Bernstein et al., 1980; Herlyn et al., 1980, 1983; Embleton et al., 1981; Seto et al., 1983; Hellström et al., 1985). Diese Heterogenität von Tumorzelllinien wurde auch von anderen Autoren beobachtet. So konnte Faraci (1974) mit Hilfe von Lymphozyten immunisierter Tiere immunologische Unterschiede zwischen einem primären methylcholanthren - induzierten Fibrosarkom und dessen Lungenmetastasen feststellen. Daraus schloß man auf die Expression von "Neoantigenen", durch die sich Metastasen von ihren Primärtumoren unterscheiden. Auch Dexter et al. (1981) berichten von Unterschieden in Karyotyp, Morphologie und Klonierungsrate bei Zellen einer frühen Phase eines humanen Koloadenokarzinoms.

Mit der Entwicklung monoklonaler Antikörper wurde es möglich, die Heterogenität der Tumorzellpopulationen genauer zu untersuchen. Mit Hilfe des indirekten Immunofluoreszenz-

testes (Yeh et al., 1981; Herrmann et al., 1983; Natali et al., 1983; Stavrou et al., 1983), des Zytotoxizitätstestes - unter Verwendung monoklonaler Antikörper mit Komplement (Yeh et al., 1981; Stavrou et al., 1984) und ohne Komplement (Dippold et al., 1984) - sowie der Peroxidase-anti-Peroxidase Immunhistologie (Wikstrand et al., 1983) konnte nachgewiesen werden, daß Primärtumoren und die daraus etablierten Zellkulturen bezüglich Expression der tumorspezifischen Antigene sehr heterogen sind.

C. PROBLEMSTELLUNG

In vorausgegangenen Untersuchungen konnten monoklonale Antikörper gewonnen werden, die spezifisch mit einem chemisch induzierten Rattengliom reagieren (Stavrou et al., 1983). Durch radioaktive Markierung einer dieser monoklonalen Antikörper (14AC1), konnte seine Eignung für die in vivo Darstellung von transplantierten Tumoren gezeigt werden (Stavrou et al. 1985a,b). Weiterhin zeigte sich, daß dieser monoklonale Antikörper auch einen antitumoralen Effekt in vitro besitzt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die mögliche Verwendung des Antikörper 14AC1 als Trägermolekül für das pflanzliche Toxin Ricin untersucht werden und inwieweit dieses "Immunotoxin" eine erhöhte antitumorale Wirkung in vitro im Vergleich zum nativen Antikörper besitzt. Weiterhin sollte unter Verwendung von transplantierten Tumoren untersucht werden, inwiefern der Antikörper auch in vivo eine antitumorale Wirkung zeigt.

D.EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 4-8 Wochen alte BALB/c-Mäuse sowie BALB/c-nu/nu-Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet. Das Futter wie auch das Trinkwasser wurde ad libitum angeboten. Die BALB/c-Mäuse erhielten als Futter Altromin^R, die BALB/c-nu/nu-Mäuse erhielten Altromin-Spezialfutter^R für Nacktmäuse und für sie wurde das Trinkwasser mit 1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt (Fortmaier, 1981). Die Käfige der Nacktmäuse wurden mit Filterdeckeln (Woetho GmbH, Teningen) zur Reduzierung der Keimzahl in der Atemluft abgedeckt.

2. Zellkulturen

2.1. Permanente Gliomzelllinie

Die verwendete Gliomzelllinie 79FR-G-41 wurde aus einem chemisch induzierten malignen Rattengliom isoliert (Stavrou et al., 1980) und als Langzeitkultur gehalten, wobei die Zellen in 260 ml Plastikflaschen (Nunc, Kamstrup) bei 37°C gezüchtet wurden. Als Nährmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Karlsruhe), dem pro Liter 10%

Fetales Bovines Serum (FBS, Flow Lab., Bonn), 100.000 I.E. Penicillin G, 0,1 g Neomycin und 0,1 g Streptomycin zugesetzt wurden. Dichtgewachsene Kulturen wurden mit Hilfe einer STV-Lösung (100 ml Saline 10fach, 25 ml 25%ige Trypsinlösung, 50 ml 1,0%ige Versene-Lösung, Aqua bi-dest ad 1000 ml) vom Kulturgefäß abgelöst und 1:10 geteilt.

Die Tumorigenität der Zelllinie wurde durch mehrfache in vivo/in vitro-Wechselpassagen gesteigert, wobei die Subklone 79FR-G-41C1 bis 79FR-G-41C11 benannt wurden.

2.2. Myelomzelllinie

Die Züchtung der Maus-Myelomzelllinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1979), die zur Produktion von Kontroll-Ascitesflüssigkeit verwendet wurde, erfolgte in 50 ml Nunc-Plastikflaschen mit Minimal Essential Medium mit Earle's Salzen (MEM, Gibco). Zu dem Medium wurde pro Liter 10% FBS, 15 mg Azaguanin, 100.000 I.E. Penicillin und 0,1 g Neomycin gegeben. Dichtgewachsene Kulturen wurden mechanisch aus dem Kulturgefäß entfernt und im Verhältnis 1:2 bis 1:10 geteilt.

2.3. Hybridomzelllinie

Die Hybridomzelllinie 14AC1 wurde durch Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit der Gliomlinie 79FR-G-41 und nachfolgender Fusion der Splenozyten mit Maus-Myelomzellen (X63-Ag8.653) gewonnen (Stavrou et al., 1983). Zur Gewinnung des monoklonalen Antikörpers 14AC1, welcher als IgG_{2a} charakterisiert wurde (Stavrou et al., 1985a,b), wurden die Hybridomzellen in 50 ml Kulturflaschen (Nunc) gezüchtet, wobei als Kulturmedium MEM verwendet wurde. Die Züchtung erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampfatosphäre im offenen System.

2.4. Mäuseperitonealzellen

Die BALB/c-Mäuse erhielten 1,0 ml Thioglycollate^R Medium 10% (Difco Lab., Detroit, USA) intraperitoneal appliziert (Schimmelpfeng et al., 1980) und wurden 4 Tage darauf durch Genickdislokation in Äthernarkose getötet. Das Thioglycollate^R wurde mindestens 1 Woche vor der Anwendung hergestellt, indem 2,98 g/100 ml in Aqua dest. durch Erhitzen bis 60°C aufgelöst wurden. Anschließend wurde die Lösung 15 min autoklaviert und bis zum Gebrauch kühl und dunkel gelagert.

Zur Gewinnung der Peritonealmakrophagen wurde die Bauchhaut der Tiere mit 70%igem Alkohol desinfiziert und nach einem Einschnitt in die Kniefalte nach cranial abgezogen. In das Abdomen wurden mittels einer Einwegspritze mit weitlumiger Kanüle (0,9 x 40 mm) 6 ml eines Standardmediums injiziert und durch mehrmaliges vorsichtiges Aspirieren und wieder Einspritzen das Abdomen gründlich ausgespült. Die Spülflüssigkeit wurde in sterile Zentrifugenröhrchen verbracht und 5 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit Medium resuspendiert, wobei die Konzentration auf 10^6 Zellen/ml eingestellt wurde. Von dieser Zellsuspension wurden pro Vertiefung einer (96)-Microtiterplatte (Nunc) 10 μ l, einer (24)-well- Platte (Nunc) 100 μ l und in eine 50 ml Plastikflasche (Nunc) 1 ml gegeben.

2.5. Maus-Osteosarkomlinie

Die Osteosarkomlinie OS 50 wurde von Dr. J. Schmidt, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg, zur Verfügung gestellt und stammt aus einem spontanen Osteosarkom einer BALB/c-Maus. Die Zelllinie wurde als Langzeitkultur entsprechend der Gliomzelllinie 79FR-G-41 gehalten.

3. Gewinnung von Ascitesflüssigkeit

Den BALB/c-Mäusen wurde 0,5 ml 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Pristane^R, Ega Chemie, Steinheim) intraperitoneal appliziert (McKearn, 1980) und 3 Wochen später 10^7 in Exponentialphase wachsende Hybridomzellen (14AC1) bzw. Myelomzellen (X63Ag8.653) in die Bauchhöhle injiziert. 6-10 Tage nach der Injektion der Zellen zeigte eine Auftreibung des Abdomens die Produktion von Ascitesflüssigkeit in der Bauchhöhle an. Die Tiere wurden mittels Äther getötet, die Punktionsstelle mit 70%igem Alkohol desinfiziert und die Ascitesflüssigkeit mit einer weitlumigen Kanüle und einer Einwegspritze abgesaugt. Das Aspirat wurde anschließend bei 1000 g 10 min zentrifugiert und das flotierende Pristane^R abgesaugt. Durch vorsichtiges Dekantieren konnten 4-6 ml zellfreie Ascitesflüssigkeit gewonnen werden, die 30 min bei 56°C zur Dekomplementierung inaktiviert wurden. Die Ascitesflüssigkeit wurde entweder nativ bei -20°C weggefroren oder mit Ammoniumsulfat präzipitiert.

4. Ammoniumsulfatpräzipitation zur Anreicherung von Immunglobulinen

Zur Konzentrierung der Immunglobuline der Ascitesflüssigkeit wurde eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung hergestellt

(1000 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ad 1000 ml Aqua dest.), die mit 30%iger NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt wurde. Ascitesflüssigkeit und Ammoniumsulfatlösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und bei 4°C eine Stunde in Eiswasser inkubiert (Jonak, 1980). Anschließend wurde das entstandene Präzipitat 30 min bei 48.000 g und 4°C in der Ultrazentrifuge (L5-50, Beckmann, München) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Präzipitat in 1 ml Aqua dest. aufgenommen, in einen Dialyseschlauch (Medicell, Wagner und Munz, München) gegeben und 48 Std. gegen 2 l PBS-A (Phosphate Buffered Saline, ohne Ca und Mg, pH 7,3) dialysiert, wobei das PBS-A nach 24 Std. erneuert wurde.

5. Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen (-85°C) wurden im Wasserbad (37°C) innerhalb 3 Minuten aufgetaut, in 5 ml Medium aufgenommen und bei 800 g 5 min zentrifugiert. Das DMSO-haltige Einfriermedium wurde verworfen, die Zellen mit frischem Kulturmedium resuspendiert und in die entsprechenden Kulturgefäße verbracht, in die 1 Tag zuvor Makrophagen als "feeder"-Zellen eingesät worden waren.

6. Indirekte Immunperoxidasefärbung

Zur Darstellung des Bindungsmusters des 14AC1 Antikörpers wurden als Targetzellen die Rattengliomzellen 79FR-G-41, sowie deren Subklone verwendet. In Terasakiplatten (Nunc) wurden pro Vertiefung 10^3 Zellen in 10 μ l ausgesät (Pateraki, 1981) und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden mit Medium aufgefüllt und je nach Teilungsrate der Zellen 24-48 Std. bebrütet. Anschließend wurde das Medium dekantiert, die Zellen einmal mit PBS-A (4 C) gewaschen und mit einem Methanol/Azeton-Gemisch (1:1, -20°C) 5 min fixiert. Die Zellen wurden 10 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet und dann mit 20 μ l Antikörperlösung 60 min bei 37°C inkubiert. Als erster Antikörper wurde unverdünnter, zellfreier Hybridomkulturüberstand, Ascitesflüssigkeit in verschiedenen Titrationsstufen sowie an Ricin-A gekoppelter monoklonaler Antikörper verwendet. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Zellen 3x mit PBS-A gewaschen, 15 min mit PBS-A inkubiert und der dreimalige Waschvorgang wiederholt. Als zweiter Antikörper wurde an Meerrettichperoxidase gekoppeltes Kaninchen-anti-Maus IgG (RAM-HRPO, Dako) verwendet, das mit PBS-A unter Zugabe von 5% FBS 1:100 verdünnt wurde. Vom zweiten Antikörper wurden ebenfalls 20 μ l pro Vertiefung zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren

Waschvorgang entsprechend dem ersten Teil der Färbung wurde zur Sichtbarmachung der Antikörper-Antigen-Reaktion das Substrat nach Nexø (1977) verwendet: 20 mg 3-amino-9-äthylcarbazol (Sigma) wurden in 5 ml Dimethylformamid (Merck) gelöst, in 95 ml 50 mM Azetatpuffer (pH 5) aufgenommen, filtriert und kurz vor Gebrauch mit 50 µl H_2O_2 (30%ig) versetzt. In die Terasakiplatten wurden 10 ml der Substratlösung gegeben und 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten unter fließendem Wasser gewaschen, mit 50%igem Glycerin eingedeckt und unter dem Mikroskop bei 230-facher Vergrößerung ausgewertet, wobei die Farbsintensität der Zellen von Grad 0 (keine Färbung) bis Grad 4 (sehr starke rot-braune Färbung) beurteilt wurde.

7. Konjugation von Ricin-A mit monoklonalem Antikörper

Die Kopplung erfolgte unter Verwendung eines Kits der Firma MEDAC (Hamburg). 5 ml Ricin-A wurden gegen 2 l 0,01 M Cystein-HCl-Puffer dialysiert und in ein 10 ml Reagenzglas transferriert. Anschließend wurden zur Reduktion 0,1 ml Dithiothreitol-Lösung (DTT) zugegeben, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Isolierung des reduzierten Ricin-A wurde eine Sephadex G-25-Säule verwendet. Als Säule wurde eine 10 ml Glaspipette verwendet, die mit 5 ml Sephadex G-25 beladen und

mit 0,005 M Natriumphosphatpuffer auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt wurde. Die DTT-vorbehandelte Ricinmischung wurde darauf gegeben, mit dem Natriumphosphat-Puffer eluiert (ca. 7,5 ml) und in ein 10 ml Reagenzglas überführt. Als Koppungspartner des Ricin-A wurde präzipitierte Ascitesflüssigkeit (14AC1) verwendet. Die Proteinmenge der Lösung wurde photometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 280 nm (Zeiss-Photometer PMQ3) sowie Berechnung nach der Formel:

$$A_{280} : 1,4 = x \text{ <mg/ml>}$$

ermittelt (Lemke et al., 1978). Die Proteinmenge wurde auf 2,5 mg/ml PBS-A eingestellt. Zu 1,4 ml dieser Lösung wurden 0,06 ml N-succinimidyl-3(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) gegeben und auf dem Schüttler gemischt. Anschließend wurde 24 Std. gegen 2 l PBS-A dialysiert. Das Dialysat, das den monoklonalen Antikörper enthielt, wurde zur Kopplung in ein 10 ml Reagenzglas überführt. Zur eigentlichen Kopplung wurden 2,5 ml Ricin-A mit 0,7 ml 14AC1 monoklonalem Antikörper gemischt, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und durch Vakuum-Dialyse auf ein Volumen von 1,2 ml eingeengt.

8. Depression der Tumorzellproliferation

Von der Rattengliomzelllinie 79FR-G-41C11 und der Mausosteosarkomzelllinie OS 50 wurden pro Vertiefung einer

24-well-Platte (Linbro) 2×10^5 Zellen ausgesät und mit Kulturmedium 24 Stunden bei 37°C bebrütet, um den Zellen ein Anhaften an das Kulturgefäß zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-A gewaschen und mit frischem Medium inkubiert, das präzipitierte Ascitesflüssigkeit (ca. $100 \mu\text{g Protein/ml Medium}$), an monoklonalen Antikörper gebundenes Ricin-A ($100 \mu\text{g/ml}$), Ricin-A allein (nach Elution aus Sephadex G-25-Säule) oder keine Antikörperzusätze enthielt. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz unverdünnt (1:1) und in Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100 durchgeführt. Die antikörper- bzw. ricinhaltige Lösung wurde 6 Tage auf den Zellen belassen und die Zellzahl bestimmt. Dafür wurden die Zellen abtrysiniert und $20 \mu\text{l}$ der Zellsuspension in eine Meßküvette (gefüllt mit 10 ml Isoton II , azidfreie stabilisierte Elektrolytlösung, Coulter Electronics GmbH, Best. Nr. 9366071) gegeben und im Coulter Counter (Coulter Electronics GmbH) gezählt.

9. ^3H -Thymidin-Einbau der Gliomzellen unter Einfluß des
monoklonalen Antikörpers 14AC1

Je Vertiefung einer 96-well-Testplatte (Nunc) wurden 5×10^5 Zellen (79FR-G-41C11) ausgesät und $100 \mu\text{l}$ Kulturmedium sowie $10 \mu\text{l}$ Antikörper zugegeben; als Antikörper wurde Ammoniumsulfat-präzipitierte und in PBS-A resuspendierte Ascites-

flüssigkeit (14AC1) (ca. 2,5 mg/ml PBS-A) wie auch mit Ricin-A gekoppelter 14AC1-Antikörper (2,5 mg/ml) verwendet. Als Kontrolle wurde Kulturmedium ohne Antikörperzugabe verwendet.

Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C mit dem Antikörper inkubiert. Anschließend wurden pro Vertiefung 10 µl ³H-Thymidin (0,37 MBq, Amersham International, Buchloe) zugegeben und weitere 24 Stunden inkubiert. Zur Ermittlung der unspezifischen ³H-Thymidinaufnahme durch Zellfragmente wurden die Zellen mittels eines Detergens (Nonidet P-40, Sigma) lysiert und mit ³H-Thymidin 24 Std. inkubiert. Zur Messung der ³H-Inkorporation wurden die Zellen 3 mal mit PBS-A gewaschen, abtrypsiniert und mittels Vakuumpumpe auf Filter (GF/C, Whatman Ltd., England) gesaugt. Nach Trocknung der Filter unter einer Lampe wurde zur Messung der Radioaktivität Aquasol (NEN, Boston, USA) zugegeben und die Proben in einem Szintillationszähler gemessen.

10. Tumor-Wachstumsdepression in vivo

BALB/c-nu/nu-Mäusen wurden 1×10^7 Zellen der Linie 79FR-G-41C11 subkutan (s.c.) transplantiert. Die Behandlung der Mäuse mit monoklonalem Antikörper erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 1,5 ml Asciteslösung (0,5 ml native Ascitesflüssigkeit + 1,0 ml PBS-A; ca 500 µg

Antikörper/ml) 30 min. nach Transplantation der Gliomzellen. Die Tiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt, von denen die erste Gruppe 14AC1-Ascitesflüssigkeit, die zweite als Kontrolle unspezifisches Maus-Immunglobulin und die dritte keine Antikörperinjektionen erhielt. Die Behandlung der ersten zwei Gruppen wurde über 2 bzw. 4 Wochen alle 2 Tage durchgeführt. Die nach 5 Tagen sichtbaren subkutanen Tumoren wurden ebenfalls alle 2 Tage mit der Schublehre vermessen (Länge x Breite x Tiefe) und das Volumen bestimmt. Die Tiere der Versuchsgruppe, die den monoklonalen Antikörper 14AC1 bekam, wurden nach 18 Tagen in zwei neue Gruppen aufgeteilt, wobei die eine Hälfte weiterbehandelt wurde, während die andere keine Injektionen mehr bekam. Die Behandlung mit unspezifischem Maus-IgG wurde ebenfalls fortgesetzt. Bei Versuchsende (28 Tage nach Inokulation der Gliomzellen) wurden alle Tiere getötet, die Tumoren vorsichtig und vollständig präpariert und gewogen.

Ein Teil der Tumoren wurde zusätzlich histologisch wie auch immunhistochemisch untersucht.

11. Beeinflussung der Bildung von Organmetastasen nach i.v.

Injektion von 14AC1-behandelten Gliomzellen

79FR-G-41C11-Zellen wurden mittels STV-Lösung vom Kulturgefäß abgelöst, einmal mit PBS gewaschen und auf 10^7 Zellen/ml eingestellt. 1 ml dieser Zellsuspension wurde pelletiert und mit 5 ml zellfreiem Hybridomüberstand (Antikörpergehalt $10 \mu\text{g/ml}$) resuspendiert. Als Kontrollen wurden dieselbe Zellzahl mit 5 ml Kulturmedium, das mit $10 \mu\text{g/ml}$ unspezifischem Maus-IgG (Sigma) substituiert worden war, oder 5 ml Kulturmedium ohne zugefügtes Immunglobulin resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend pelletiert und in 1 ml PBS-A aufgenommen. $100 \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension (10^6 Zellen) wurden den BALB/c-nu/nu Mäusen intravenös (i.v.) unter Verwendung einer feinelumigen Kanüle ($0.4 \times 20 \text{ mm}$) injiziert. Zur i.v. Injektion wurde die dorsale oder laterale Schwanzvene verwendet, nachdem durch kurze Erwärmung in 40°C warmen Wasser eine Hyperthermie erzeugt worden war. 3 Wochen nach Injektion wurden die Tiere getötet und Lunge, Niere, Milz sowie Leber auf Metastasen untersucht, die sich makroskopisch als weiße Knötchen auf den Organoberflächen darstellten. Die Lungen wurden zusätzlich noch histologisch auf das Vorhandensein von Metastasen untersucht.

II. Ergebnisse

1. Bindungsfähigkeit von nativem und an Ricin-A gekoppeltem monoklonalen Antikörper 14AC1

Die Bindungsfähigkeit des monoklonalen Antikörpers 14AC1 vor und nach der Konjugation mit Ricin A wurde mit der indirekten Immunperoxidasefärbung nachgewiesen.

Der native wie auch der an Ricin-A gekoppelte Antikörper wurde 1:100, 1:300 und 1:1000 verdünnt und als erster Antikörper für die Färbung der Gliomzellen verwendet.

Wie in Tabelle 1 und Abb.1 zu sehen ist, zeigte sowohl der native, als auch der konjugierte monoklonale Antikörper deutlich positive Reaktionen bis zu einer Verdünnung von 1:1000. Zwischen nativem und konjugiertem monoklonalen Antikörper war in der indirekten Immunperoxidasefärbung kein Unterschied festzustellen.

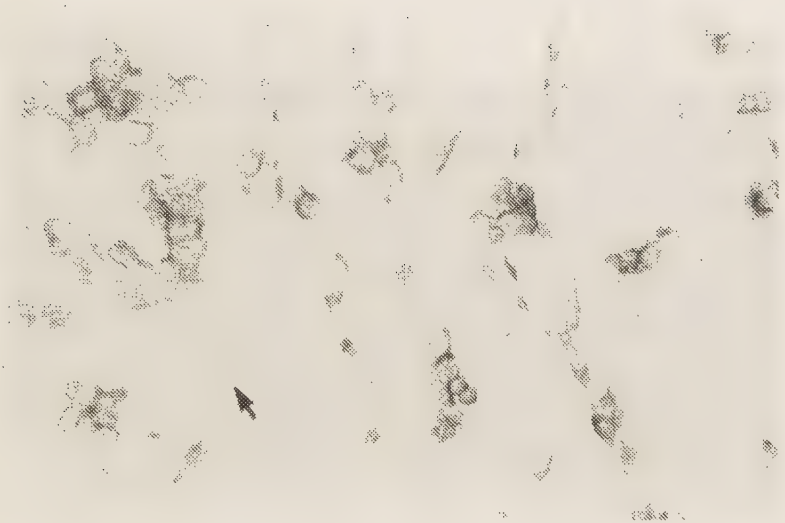


Abb.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung zur Darstellung der Bindungsfähigkeit des monoklonalen Antikörpers 14Acl; ein Teil der Zellen (↑) wird vom monoklonalen Antikörper nicht erkannt (x 200).

Tabelle 1: Indirekte Immunoperoxidasefärbung von Gliomzellen mittels nativem wie auch an Ricin-A gekoppeltem monoklonalen Antikörper (Bewertungsskala 0-4)

Verdünnung	14AC1-Antikörper	14AC1-Ricin-A-Konjugat
1:100	4	4
1:300	3	3
1:1000	1	1

2. Depression der Tumorzellproliferation in vitro durch den monoklonalen Antikörper 14AC1 und 14AC1-Ricin-A-Immunotoxin

Die Gliomzellen wurden 6 Tage bei Anwesenheit von Immunotoxin (14AC1-Ricin-A), ungebundenem monoklonalen Antikörper (14AC1), unspezifischem Maus-IgG sowie Medium ohne Antikörperzusätze inkubiert und anschließend die Zellzahl bestimmt (3-fach Ansätze).

Die Kontrollen, die mit Medium ohne Antikörperzusatz sowie mit unspezifischem Maus-IgG inkubiert worden waren, erreichten mit 186.500 bzw. 188.000 die höchsten Zellzahlen (Tabelle 2). Auch die Inkubation mit Ricin-A ohne gebundenen

Antikörper zeigte in der verwendeten Dosis keinen zytopathischen Effekt auf die Zellen (184.000 Zellen/ml). Das 14AC1-Ricin-A Konjugat bewirkte den stärksten zytopathischen Effekt (81.000 Zellen/ml), der sich durch Verdünnen des Immunotoxins abschwächte, resultierend in 119.000 und 126.000 Zellen/ml bei Verdünnungen von 1:10 bzw. 1:100. Der ungebundene monoklonale Antikörper zeigte unverdünnt einen schwächeren, aber doch deutlichen zytopathischen Effekt auf die Gliomzellen (130.000 Zellen/ml), der jedoch nach Verdünnung (1:10) kaum noch messbar war (176.000 Zellen/ml). Die Bindung des monoklonalen Antikörpers an die Ricin-A-Kette resultierte somit in einer um den Faktor 100 wirksameren Zytotoxizitätsdosis in vitro.

Tabelle 2. Einfluß des Immunotoxins und des monoklonalen Antikörpers auf das Wachstum der Gliomzellen (79FR-G-41C11) in vitro.

Inkubationsmedium	Zellzahl/ml	% von Kontrolle
DMEM	188 000	100,0
DMEM + Maus-IgG	186 500	99,2
DMEM + Ricin-A	184 000	97,9
DMEM + 14AC1-Ricin-A 1:1	81 000	43,1
DMEM + 14AC1-Ricin-A 1:10	119 000	63,3
DMEM + 14AC1-Ricin-A 1:100	126 000	67,0
DMEM + 14AC1 1:1	130 000	69,1
DMEM + 14AC1 1:10	176 000	93,6

3. ³H-Thymidin-Einbau der Gliomzellen unter Einfluß des monoklonalen Antikörpers 14AC1

Die Bestimmung der Proliferationsrate der Zellen unter Einfluß von nativem bzw. an Ricin-A gekoppeltem monoklonalen Antikörper wurde mittels ³H-Thymidin-Einbau der Zellen bestimmt (Tabelle 3). Die Zellen, die mit dem 14AC1-Ricin-

A-Konjugat inkubiert worden waren (22 790 cpm), zeigten gegenüber den nur mit monoklonalem Antikörper inkubierten Zellen (67 828 cpm) und der Kontrolle mit Medium (99 647 cpm) einen deutlich herabgesetzten ^3H -Thymidin-Einbau. Bei der Detergens-Kontrolle für die unspezifische ^3H -Thymidinaufnahme wurden 1 512 cpm gemessen.

Tabelle 3. ^3H -Thymidin-Einbau unter Einfluß des monoklonalen Antikörpers 14AC1 sowie dessen Ricin-A-Konjugat.

Inkubationsmedium	cpm/well
DMEM + 14AC1-Ricin-A	22 790
DMEM + 14AC1	67 828
DMEM	99 647
Nonidet P-40	1 512

4. Tumor-Wachstumsdepression in vivo

Zur Untersuchung der Frage, inwieweit der monoklonale Antikörper 14AC1 auch in vivo einen antitumoralen Effekt auf die Gliomlinie 79FR-G-41C11 zeigt, wurden BALB/c-nu/nu Mäusen

Tumorzellen s.c. inokuiert und die Mäuse anschließend i.p. mit 14AC1 behandelt.

Die Tiere wurden in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt:

Die 1. Gruppe, bestehend aus 10 Tieren, diente als Kontrollgruppe (ohne Antikörper-Behandlung).

Die 2. Gruppe, bestehend aus 10 Tieren wurde mit unspezifischem Maus-IgG behandelt.

Die 3. Gruppe, bestehend aus 20 Tieren, wurde alle 2 Tage mit dem 14AC1-Antikörper i.p. behandelt.

Die ersten sichtbaren Tumoren traten am 5. Tag des Versuches auf, die Messung der Tumoren erfolgte ab dem 7. Tag. Von diesem Zeitpunkt an wurde das Tumorstadium bei allen Tieren alle 2-3 Tage mit der Schublehre gemessen. Die Tumoren wuchsen in den Gruppen 1 und 2 von $0,6 \text{ cm}^3$ am Tag 7 bis zu einem Volumen von fast $8,0 \text{ cm}^3$ am Tag 18, in der mit dem Antikörper behandelten Gruppe von $0,6 \text{ cm}^3$ bis $4,8 \text{ cm}^3$ (Tabelle 4, Abb.2 und 3). Am Tag 18 wurde die Gruppe 3 aufgeteilt in Tiere, die weiterbehandelt wurden (3a) und Tiere, die keinen monoklonalen Antikörper mehr injiziert bekamen (3b). Die Tumoren in der Gruppe 3a erreichten bis Tag 28 ein Volumen von 11 cm^3 , während in der Gruppe 3b am Tag 28 die Tumorstadium bis zu 20 cm^3 betrug (Tab.5, Abb.4 und 5).

Durch Behandlung der Nacktmäuse mit dem 14AC1-Antikörper konnte somit eine Reduzierung des Tumorstadiums bis zu ca.

50% erzielt werden. Nach Entnahme der Tumoren bei Versuchsende zeigten die Anschnitte von Tumoren behandelte wie auch unbehandelte Tiere makroskopisch solide Tumormassen mit zentral zum Teil nekrotischen Arealen.

Tabelle 4. Wachstumsdepression der Gliomtransplantate in BALB/c-nu/nu-Mäusen durch 14AC1-Ascitesflüssigkeit, ausgedrückt als Tumolvolumen (cm³)

Tag	Keine Behandlung	X63/ Maus- IgG	14AC1 Anti- körper	Wachstums- depression (%) der Kontrolle)
7	0,6 ($\pm 0,2$)	0,6 ($\pm 0,2$)	0,3 ($\pm 0,1$)	50,0
10	1,7 ($\pm 0,5$)	1,6 ($\pm 0,4$)	0,6 ($\pm 0,3$)	62,5
13	3,9 ($\pm 1,1$)	3,9 ($\pm 1,0$)	1,1 ($\pm 0,5$)	71,9
16	6,2 ($\pm 1,3$)	5,9 ($\pm 1,5$)	2,2 ($\pm 0,6$)	63,6
18	8,1 ($\pm 1,9$)	7,9 ($\pm 2,0$)	3,6 ($\pm 1,0$)	55,0

Tabelle 5. Wachstum der Gliomtransplantate in BALB/c-nu/nu-Mäusen nach Behandlungsende am Tag 18 bzw. unter weiterem Einfluß des monoklonalen Antikörpers, festgestellt anhand des Tumolvolumens (cm³)

Tag	Ohne Weiter- behandlung	Weitergeführte 14AC1-Behandlung
18	4,1 (<u>+1</u> ,9)	4,1 (<u>+2</u> ,0)
21	6,0 (<u>+2</u> ,8)	4,8 (<u>+2</u> ,5)
23	10,8 (<u>+4</u> ,0)	5,9 (<u>+2</u> ,8)
25	14,2 (<u>+5</u> ,1)	7,2 (<u>+3</u> ,2)
27	20,2 (<u>+8</u> ,3)	11,7 (<u>+5</u> ,3)

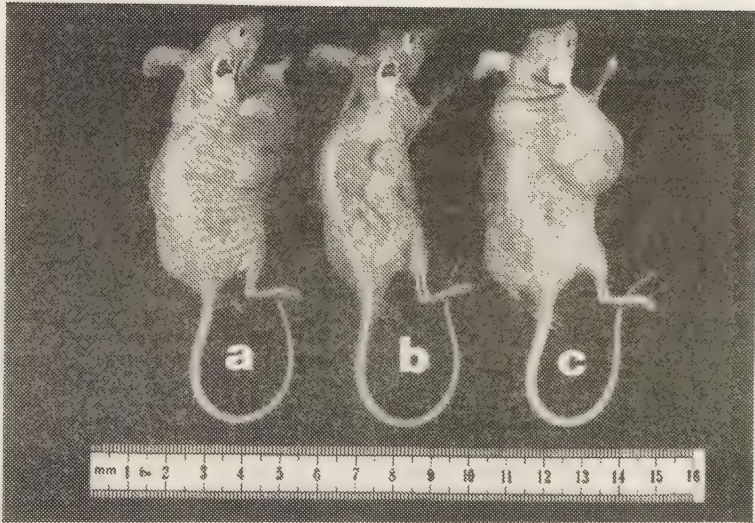


Abb.2. Wachstumsdepression von Gliomtransplantaten in BALB/c-nu/nu-Mäusen durch Behandlung mit 14AC1 (b) im Vergleich zu unbehandelten (a) und mit unspezifischem Maus-IgG (c) behandelten Tieren.

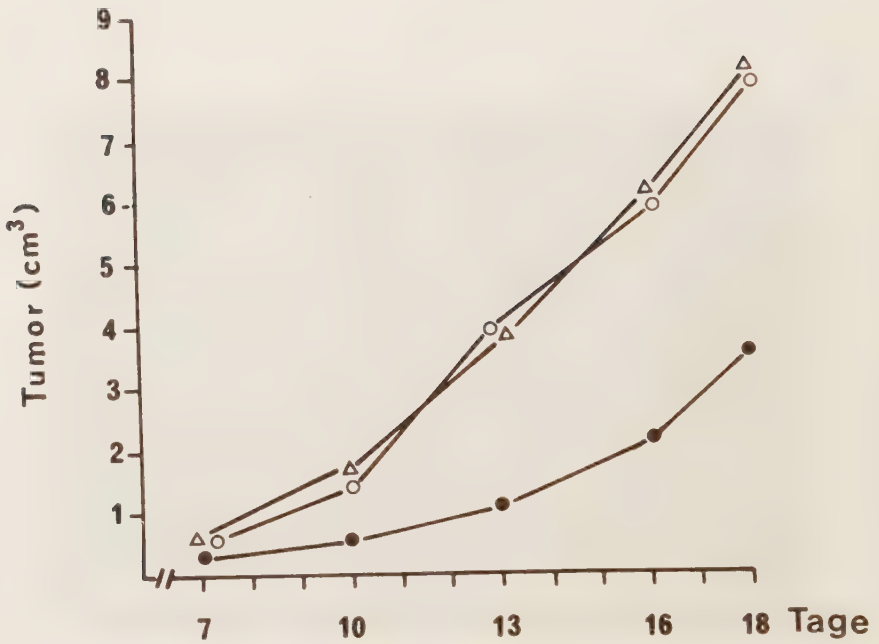


Abb.3. Reduzierte Tumorgroße von transplantierten Rattengliomen in BALB/c-nu/nu-Mäusen unter Einfluß des monoklonalen Antikörpers 14AC1 (- ● -), im Vergleich zu X63-Ag8.653-Ascitesflüssigkeit/normalem Maus-IgG (- ○ -), sowie ohne Behandlung (- Δ -).

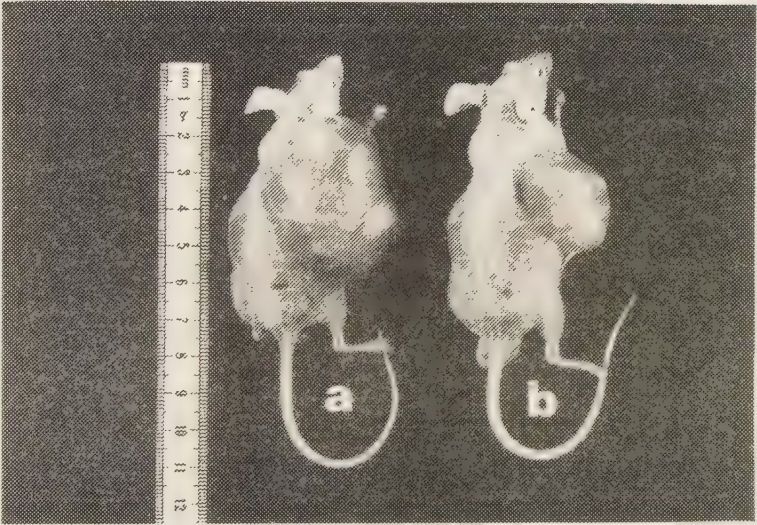


Abb.4. Ungehindertes Wachstum von Gliomtransplantaten in BALB/c-nu/nu-Mäusen nach Beendigung der Antikörperbehandlung am 18.Tag (a) im Vergleich zur Weiterbehandlung mit 14AC1 (b) (28 Tage nach Transplantation).

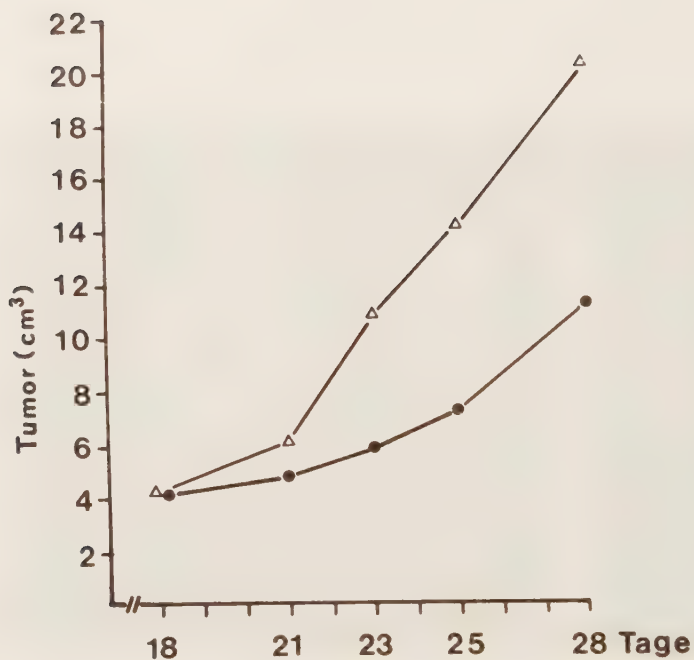


Abb. 5. Tumorgroße von Rattenglomen in BALB/c-nu/nu-Mäusen nach Beendigung der Antikörperbehandlung am Tag 18 (- Δ -), bzw. Weiterbehandlung (- ● -).

Tabelle 6: Tumorgewichte bei Versuchsende (28.Tag nach der Transplantation)

Tumorgewicht (g)	
Ohne 14AC1-Weiterbehandlung	17,6
Mit 14AC1-Weiterbehandlung	9,4

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, lagen bei Versuchsende in Übereinstimmung mit dem Tumolvolumen auch die Tumorgewichte von Gruppe 3a (nicht weiterbehandelt) mit 17,6 g im Mittel deutlich über dem der Gruppe 3b (weiterbehandelt) mit 9,4 g.

5. Beeinflussung der Metastasenbildung nach i.v. Injektion von 14AC1-behandelten Gliomzellen

Um den Einfluß des monoklonalen Antikörpers 14AC1 auf die Bildung von Metastasen nach i.v.-Injektion von Gliomzellen zu untersuchen, wurden 79FR-G-41-Zellen mit 14AC1 vorbehandelt und den Nacktmäusen i.v. injiziert. Für die Untersuchungen wurden 3 Gruppen bestehend aus je 8 Mäusen gebil-

det: Der Gruppe A wurden 14AC1-vorbehandelte Gliomzellen injiziert, der Gruppe B unbehandelte Gliomzellen und der Gruppe C wurden Zellen gespritzt, die mit unspezifischem Maus-IgG vorbehandelt worden waren.

Die makroskopische Ermittlung der Anzahl der Organmetastasen 21 Tage nach Injektion ergab folgendes Ergebnis (Durchschnittswerte): In Gruppe A wurden 10,2 Lungenmetastasen gefunden, in Gruppe B 40,1 und in Gruppe C 39,2. In den Nieren traten nur in Gruppe B (8,2) und in Gruppe C (7,3) Metastasen auf. Zusätzlich wurden bei einem Tier der Kontrollgruppe B auch eine Metastase in der Leber gefunden.

Tabelle 7. Wirkung des monoklonalen Antikörpers 14AC1 auf Metastasenbildung durch die Gliomzelllinie 79FR-G-41C11.

Anzahl der Metastasen in:			
	Lunge	Niere	Leber
A: 14AC1-Antikörper	10,2 (4-19)	0	0
B: Kein Antikörper	40,2 (26-51)	8,2 (6-12)	1
C: Maus-IgG	39,2 (27-50)	7,3 (3-10)	0

Auch die histologischen Untersuchungen der Lungen ergaben - wie aus Abb.6 zu sehen ist - eine im Vergleich zur Kontrolle (B) deutlich herabgesetzte Anzahl an metastatischen Läsionen bei den Tieren, denen mit 14AC1-vorbehandelte Gliomzellen injiziert worden waren (A). Die Metastasen stellten sich im histologischen Schnitt als dunkle, homogene, klar abgegrenzte Bezirke dar, wobei zwischen der behandelten und der Kontrollgruppe bezüglich der histologischen Struktur der Einzelmetastasen keine Unterschiede festzustellen waren.

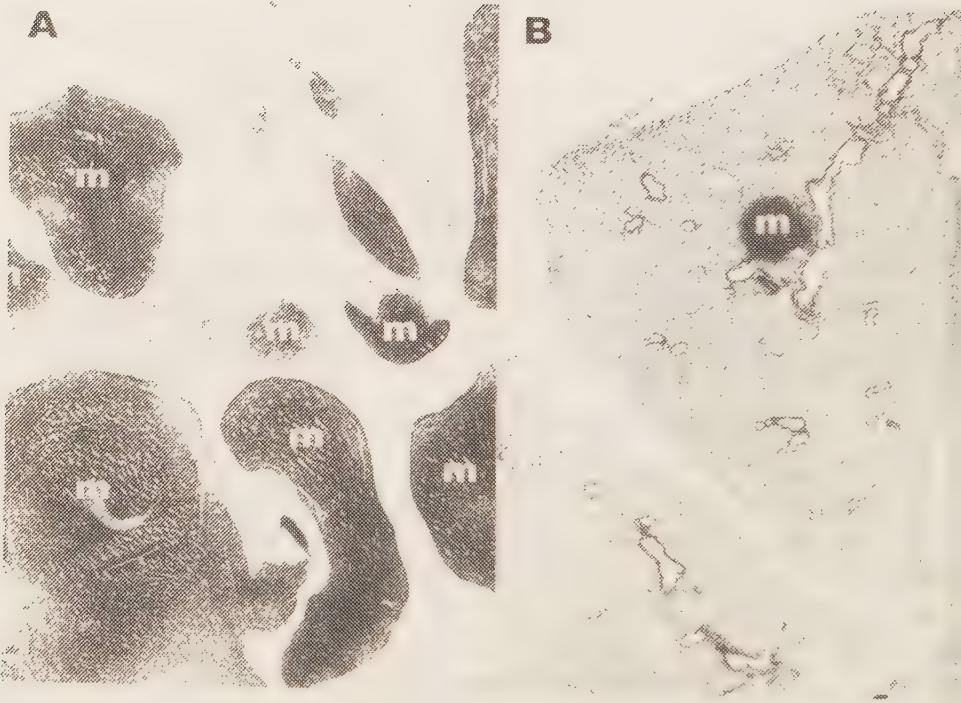


Abb.6. Metastatische Läsionen (m) durch 79FR-G-41 Tumorzellen in den Lungen von BALB/c-nu/nu-Mäusen am 12. Tag nach der i.v. Applikation von 1×10^6 unbehandelten (A) und mit dem 14AC1-Antikörper behandelten Gliomzellen (B). Die Vorbehandlung der Gliomzellen mit monoklonalem Antikörper führte zu einer deutlichen Verringerung der Metastasen. (HE-Färbung, x 10)

E. DISKUSSION

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß der monoklonale Antikörper 14AC1 antitumorale Wirkung auf die Rattengliomzelllinie 79FR-G-41 hat.

Durch in vitro-Behandlung der Gliomzellen mit nativem Antikörper (Ascitesflüssigkeit) ohne exogene Komplementzugabe konnte eine deutliche Proliferationsdepression der Gliomzellen festgestellt werden. Diese drückte sich im Vergleich zu den Kontrollen in einer verringerten Zellzahl, sowie in einem geringeren ^3H -Thymidineinbau der 14AC1-behandelten Zellen aus. Bei ähnlichen Untersuchungen konnte ein Abrunden der normalerweise astrozytenartigen Zellen, ein Ablösen vom Kulturgefäß unter Antikörpereinfluß, sowie elektronenmikroskopisch eine Raffung der Zellmembran und ein Verlust der Mikrovilli beobachtet werden (Stavrou et al., 1986). Diese Änderungen der Morphologie lassen vermuten, daß der monoklonale Antikörper zu Veränderungen der Zellmembranen führt und dadurch der Stoffwechsel der Zellen beeinträchtigt wird (Lederer et al., 1984). Die Regulierung des Zellwachstums über bestimmte Glycolipide in der Zellmembran wurde von Lingwood und Hakomori (1977) berichtet. Eine Störung der Glykolipidzusammensetzung der Zellmembran hätte somit möglicherweise eine gestörte Wachstumsrate zur Folge. Eine Blockierung des Zellzyklus mit monoklonalen

Antikörpern gegen menschliche Melanomzellen konnten Dippold et al. (1984) erzielen, wobei sie als Ursache für den wachstumshemmenden Effekt der Antikörper ein Eintreten der Zellen in die G_0 -Phase vermuteten. Andere Untersucher haben gezeigt, daß das Wachstum von Tumorzellen durch verschiedene Hormone und Wachstumsfaktoren kontrolliert wird, für die an der Zelloberfläche spezifische Rezeptoren exprimiert werden (Barnes und Sato, 1980). Diese Rezeptoren stellen ihrerseits wiederum Antigene dar, gegen die monoklonale Antikörper mit z.T. antitumoralen Eigenschaften produziert werden können (Kawamoto et al., 1983).

In vorausgegangenen Studien erwies sich der monoklonale Antikörper 14AC1 als geeignetes Transportmolekül für das Radioisotop ^{131}I zur in vivo-Darstellung von transplantierten Rattengliomen in Nacktmäusen (Stavrou et al., 1985a,b). Das bedeutet, daß die 79FR-G-41 Gliomzellen auch in vivo Antigene exprimieren, die von dem Antikörper 14AC1 erkannt werden können. Unter Verwendung von s.c. transplantierten Gliomen bei Nacktmäusen wurde nun untersucht, inwieweit der Antikörper auch in vivo - wie in vitro - einen antitumoralen Effekt zeigt. Die Behandlung der Mäuse erfolgte über i.p. Injektion nativer Ascitesflüssigkeit. Dabei war eine deutliche Wachstumsverzögerung der Transplantate (ca. 50% des Tumolvolumens im Vergleich zu den Kontrollen)

zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit monoklonalen Antikörpern gegen menschliche Kolorektalkarzinome (Herlyn et al., 1980), gegen Mäuseleukämie (Bernstein et al., 1980), gegen Mammatumoren bei Ratten (Embleton et al., 1981) sowie Mäusen (Seto et al., 1983) und gegen menschliche Melanome (Hellström et al., 1985) erzielt. Bei diesen Untersuchungen war durch die Therapie mit monoklonalen Antikörpern jeweils nur eine Wachstumsdepression der Tumoren, jedoch nie eine vollständige Regression zu erzielen. Auch bei dem hier verwendeten Antikörper 14AC1 konnte in keinem Falle das Entstehen eines s.c. wachsenden Tumors vollständig verhindert werden. Darüber hinaus begannen die Tumoren bei Beendigung der Therapie sehr schnell an Volumen zuzunehmen, während unter Antikörpereinfluß nur ein langsames Wachstum zu beobachten war. Der Mechanismus dieser Therapiewirkung ist noch nicht geklärt und auch die histologische Untersuchung der Transplantate ergab keine Hinweise auf Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tumoren, insbesondere im Hinblick auf das Vorkommen regressiver Erscheinungen sowie einer erhöhten Makrophagenzahl, wie sie von Adams et al. (1984) beschrieben wurden. In diesem Zusammenhang dürfte der Immunglobulinsubklasse des Antikörpers 14AC1 (IgG_{2a}) wesentliche Bedeutung zukommen. Masui et al. (1986) untersuchten den Mechanismus der Wachstumsdepression durch

monoklonale Antikörper gegen Wachstumsfaktor-Rezeptoren, indem sie monoklonale Antikörper verschiedener Subklassen (IgG_{2a} , IgG_1) gegen diese Rezeptoren produzierten. Sie stellten fest, daß diese monoklonalen Antikörper die Funktion der Rezeptoren verändern können, wodurch eine antitumorale Wirkung entstand. Dabei konnte für den monoklonalen Antikörper vom IgG_{2a} -Subtyp eine Mitbeteiligung von aktivierten Makrophagen bei der antitumoralen Wirkung nachgewiesen werden. Auch Steplewski et al. (1983) berichteten, daß von den gegen menschliche Tumoren gerichteten monoklonalen Antikörpern nur Antikörper der Subklasse IgG_{2a} das Wachstum von Transplantaten in Nacktmäusen beeinflussen können und ihre antitumorale Aktivität durch Makrophagen vermittelt wird. Denkers et al. (1985) konnten durch in vitro-Versuche sowohl für komplement- als auch für zellvermittelte Zytotoxizität der monoklonalen Antikörper eine wesentlich höhere Aktivität der IgG_{2a} -Antikörper im Vergleich zu Antikörpern der IgG_1 -Subklasse feststellen. Auch der 14AC1-Antikörper zeigte in vitro eine komplementvermittelte (CDC) (Stavrou et al., 1984) wie auch zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) (Bilzer et al., 1984), ein Umstand, welcher bei der Interpretation des in vivo-Wirkungsmechanismus ebenfalls in Betracht zu ziehen ist.

Die i.v. Verabreichung von 14AC1-vorbehandelten Gliomzellen zeigte, daß durch die Vorbehandlung der Zellen mit dem monoklonalen Antikörper eine Metastasenbildung in verschiedenen Organen verringert werden kann. Auch Vollmers und Birchmeier (1983) gelang es, durch Behandlung von B16 Melanomzellen mit monoklonalen Antikörpern die Metastasierung zu beeinträchtigen. Der Wirkungsmechanismus dieser Beeinflussung der Metastasenbildung ist noch nicht geklärt. Denkbar wäre eine Veränderung der Zellmembran durch den monoklonalen Antikörper, wodurch die Adhäsion der Tumorzellen an der Kapillarwand beeinträchtigt werden könnte. Dies hätte wiederum eine Verlängerung der Tumorzellzirkulation in der Blutbahn zur Folge, wodurch der körpereigenen Immunabwehr, insbesondere den Makrophagen, mehr Zeit für die Lysis der Tumorzellen zur Verfügung stünde.

In weitergehenden Untersuchungen wurde der monoklonale Antikörper 14AC1 an die A-Kette des hochtoxischen Pflanzengiftes Ricin gekoppelt und die Wirkung dieses Konjugates auf kultivierte Gliomzellen getestet. Durch die Kopplung von monoklonalen Antikörpern an Toxine ist es möglich, die Spezifität des monoklonalen Antikörpers mit den hoch zytotoxischen Eigenschaften des Toxins zu verbinden. Wichtig ist hierbei, daß beide Liganden ihre Aktivitäten durch die Kopplung nicht verlieren. Das hier verwendetet Ricin gehört

zu einem der wirksamsten und daher auch am häufigsten für Konjugationen verwendeten Toxine. Bei vergleichenden Untersuchungen mit Immunotoxinen, die selektiv gegen Mammacarcinome gerichtet waren und unter Verwendung von Ricin, Diphtherie-Toxin-A oder *Phytolacca americana* protein II (PAP II) gekoppelt worden waren, zeigte sich, daß die Konjugate auf Ricinbasis in vitro die größte Zytotoxizität aufwiesen (Bjorn, 1984). Die Untersuchungen von Embleton et al. (1986) mit Methotrexat-Konjugat ergaben, daß das Medikamentenkonjugat im Vergleich zu Ricin-A-Konjugaten zwar eine höhere Spezifität besitzt, das Ricinkonjugat aber ein höheres toxisches Potential aufweist. Um Tumorzellen irreversibel zu schädigen, wurden somit weit weniger Ricin-Konjugatmengen benötigt als Methotrexatkonjugate. Dies ging allerdings auf Kosten der therapeutischen Breite. So dürfte besonders dann der Einsatz von Ricinkonjugaten angezeigt sein, wenn die Zielzelle eine relativ geringe Antigenexpression besitzt und damit nur wenige Targetmoleküle für die monoklonalen Antikörper auf der Zelloberfläche erkennbar sind.

Für die Bindung zwischen dem monoklonalen Antikörper und dem Ricin wurden für die vorliegenden Untersuchungen reversible Disulfidbrücken verwendet, die, wie Masuho et al. (1982) zeigen konnten, eine wesentlich höhere Toxizität der Konjugate bedingen als Thioätherbindungen.

Die Aktivität des monoklonalen Antikörpers vor und nach der Kopplung wurde mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase-Färbung überprüft und ergab keine Beeinträchtigung der Bindungsfähigkeit. Der wachstumshemmende Titer des monoklonalen Antikörpers 14AC1 konnte durch Kopplung an Ricin-A um 2 log-Stufen erhöht werden, wie mittels Bestimmung der Zellzahl und des Einbaus von ^3H -Thymidin zu sehen war. Dabei war aber in keinem Falle eine vollständige Inhibition des Tumorstwachstums zu beobachten. Dies steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei der Tumorstwachstumsdepression in vivo bzw. der Beeinflussung der Metastasenbildung, wobei hier lediglich eine Reduktion der Transplantatgröße bzw. Anzahl der Metastasen erzielt werden konnte. Als ein Grund für diesen nur teilweisen antitumoralen Effekt des monoklonalen Antikörpers 14AC1 auf Gliomzellen muß die Heterogenität der Tumorkultur angesehen werden, wodurch ein Teil der Gliomzellen nicht vom Antikörper erkannt werden. Die Heterogenität der verwendeten Tumorzelllinie wurde bereits in der indirekten Immunperoxidasefärbung beobachtet, bei der bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers 14AC1 nie alle Zellen angefärbt werden konnten. Weiterhin war es auch nicht möglich, durch Zytotoxizitätstests unter Verwendung von Kaninchenkomplement alle Zellen der Tumorzelllinie zu lysieren (Stavrou et al.,

1984). Durch wiederholte Behandlung der Linie mit 14AC1 konnte darüberhinaus eine Zelllinie etabliert werden, die in der indirekten Immunperoxidasefärbung keine Reaktion mit dem Antikörper mehr zeigte (Stavrou et al. 1986).

Der hohe Antikörpereinsatz für die Tumorwachstumsdepression in vivo (ca. 500 μ g Antikörper pro Injektion) wäre möglicherweise durch Verwendung von Immunotoxinen zu reduzieren. Dabei wäre allerdings die metabolische Halbwertszeit der Konjugate und ihre Verteilung im Gewebe zu beachten. Jansen et al. (1980) vermuteten, daß die relativ kurze Serumhalbwertszeit der Konjugate (30 min) mit der Hydrophobie der A-Kette zusammenhängt. Um Immunotoxinen das Erreichen von Tumorzellen zu ermöglichen, die solide Tumoren mit dichtem Gewebeverband bilden, schlagen Vitetta et al. (1983a) vor, entweder Vasodilatoren wie Histamin an die Immunotoxine zu binden, um ihnen damit das Überwinden der Blut-Gewebe-Schranke zu erleichtern, oder durch Verwendung von F(ab') Fragmenten das Immunotoxinmolekül zu verkleinern. Die Kopplung von F(ab') Fragmenten anstelle eines kompletten IgG-Moleküls hätte auch den Vorteil, daß die Bindungsaktivität des Fc-Fragmentes für Zellen mit Fc-Rezeptoren wie z.B. Lymphozyten wegfallen würde. Dies würde mögliche unspezifische Reaktionen verhindern und somit die Selektivität und Spezifität der Konjugate erhöhen.

Die Kombination von Immunotoxinen, deren unterschiedliche Antikörperanteile gegen mehrere Oberflächenantigene von Tumorzellen gerichtet sind, könnte eine weitere Steigerung der Effektivität bewirken. Durch zusätzliche Steigerung der unspezifischen Immunabwehr der Patienten, wie sie z.B. Baba et al. (1986) und Boman et al. (1981) vorgeschlagen haben, könnten auch die Tumorzellen erreicht werden, die der Behandlung mit den Immunotoxinen standgehalten haben. Dies würde auch den Erkenntnissen entgegenkommen, daß gliomtragende Patienten eine abgeschwächte Immunkompetenz aufweisen (Thomas et al., 1975; Brooks et al., 1980). Gateley et al. (1982) vermuten Abwehrmechanismen der Gliomzellen, wie z.B. verminderte Immunogenität, eine schützende Mucopolysaccharidhülle oder die Produktion von immunsuppressiven Makromolekülen, die sie gegen Angriffe des Immunsystems schützen.

Andererseits ist nicht auszuschließen, daß gegen die Immunotoxine, die ja selbst auch fremde Proteine darstellen, Antikörper von seiten des Organismus gebildet werden, wodurch der therapeutischen Verwendung der Immunotoxine Grenzen gesetzt sind.

Als weiterer Ansatzpunkt für eine verbesserte Therapie mittels Immunotoxinen wäre es denkbar, mit Hilfe der Gentechnologie verbesserte Immunotoxine zu synthetisieren, in

denen der monoklonale Antikörper und das Toxin durch rekombinierende DNA-Technologie vollkommen miteinander verbunden wären. Tatsächlich ist es inzwischen gelungen, durch Fusion von einem Gen einer schweren Kette eines Immunoglobulins mit einem Gen eines Enzyms ein Antikörper-Enzym-Hybrid zu konstruieren (Neuberger et al., 1984). Auf diesem Wege könnte es möglich sein, eine neue Generation von immunopharmakologischen Reagentien zu entwickeln.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die antitumoralen Eigenschaften monoklonaler Antikörper gegen Gliome wurden unter Verwendung von etablierten Hybridomzelllinien, die monoklonale Antikörper (14AC1) gegen chemisch induzierte Rattengliome (79FR-G-41) sezernieren, in vitro und in vivo untersucht. Dabei wurden für die Untersuchungen sowohl native Antikörper als auch durch Konjugation mit Ricin-A hergestellte Immunotoxine verwendet. Das Bindungsmuster des 14AC1-Antikörpers wie auch des Ricin-A-Konjugates an die Gliomzellen wurde mittels der indirekten Immunperoxidasefärbung ermittelt, wobei keine Unterschiede zwischen nativem Antikörper und Konjugat gesehen werden konnten.

Die antitumoralen Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers 14AC1 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Durch den monoklonalen Antikörper 14AC1 und das 14AC1-Ricin-A-Immunotoxin wurde in vitro eine Wachstumsdepression bei der Gliomzelllinie 79FR-G-41 bewirkt, die sowohl durch die Ermittlung der Zellzahl als auch durch die Messung der ³H-Thymidineinbaurate festzustellen war. Die wirksame Dosis des Antikörpers konnte dabei durch Kopplung an Ricin-A um den Faktor 100 gesteigert werden.

2. Eine 14AC1-Antikörper bedingte Tumorstillstand-Depression in vivo konnte durch mehrmalige Injektion von 14AC1-Ascitesflüssigkeit bei Nacktmäusen mit Gliomtransplantaten beobachtet werden. Die Behandlung führte - im Vergleich zu den Kontrollen - zur Reduktion des Tumorstillstands bis zu 50%.

3. Durch Vorbehandlung von Gliomzellen mit dem 14AC1-Antikörper konnte eine Beeinträchtigung der Bildung von Organmetastasen nach intravenöser Injektion der Zellen bei Nacktmäusen beobachtet werden. So konnte die Anzahl der Metastasen in der Lunge um ca. 75% und in der Niere um 100% reduziert werden.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die W. Sander-Stiftung (Sta-81.007.02) und durch den C. Bohneward-Fonds für Krebsforschung, Universität München, durchgeführt.

SUMMARY

ANTITUMOR PROPERTIES OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST GLIOMAS IN VITRO AND IN VIVO

The antitumor properties of monoclonal antibodies were tested in vitro and in vivo. For this purpose monoclonal antibodies (14AC1) against a chemically induced rat glioma (79FR-G-41) were obtained from an established hybridoma cell line. Analysis was carried out with native antibodies as well as with immunotoxins produced by coupling of ricin A to the antibody 14AC1. Antibody binding to glioma cells was determined by indirect immunoperoxidase staining. Using this method, no visible difference between the binding pattern of antibody 14AC1 and the ricin A immunotoxin could be detected.

The antitumor properties of monoclonal antibody 14AC1 can be summarized as follows:

1. Monoclonal antibody 14AC1 and the 14AC1-ricin A immunotoxin induced growth reduction of the glioma cell line 79FR-G-41. This was confirmed by cell counting as well as measuring of ^3H thymidine incorporation. The conjugate ricin A immunotoxin showed a 100-fold enhanced activity as compared to the native antibody 14AC1.

2. Depression of tumor growth in vivo could be observed after repeated injections of nude mice bearing glioma transplants with 14AC1 ascitic fluid. Treatment reduced tumor growth up to 50% as compared to controls.

3. Pretreatment of glioma cells with 14AC1 antibody impaired formation of organ metastases in nude mice following intravenous injections of these cells. The number of metastases was reduced by 75% in the lungs and by 100% in the kidneys.

G.LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, D. O., Hall, T., Steplewski, Z., Koprowski, H.:
Tumors undergoing rejection induced by monoclonal
antibodies of the IgG_{2a} isotype contain increased
numbers of macrophages activated for a distinctive form
of antibody-dependent cytotoxicity.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 81, 3506-3510 (1984)
- Arklie, J., Taylor-Papadimitriou, J., Bodmer, W., Egan, M.,
Millis, R.: Differentiation antigens expressed by
epithelial cells in the lactating breast are also
detectable in breast cancers.
Int. J. Cancer 28, 23-29 (1981)
- Baba, H.: Rapid tumor regression and induction of tumor-
regressing activity in serum by various
immune-modulating agents.
Int. J. Immunopharmacol. 8, 569-572 (1986)
- Baker, M.A., Taub, R.N.: Immunotherapy of human cancer.
Prog. Allergy 17, 227-299 (1973)
- Baldwin, R.W., Embleton, M.J., Pimm, M.V.: Monoclonal anti-
bodies for radiodetection of tumors and for targeting.
Bull. Cancer (Paris) 70, 132-136 (1983)

Ballou, B., Levine, G., Hakala, T.R., Solter, D.: Tumor location detected with radioactively labeled monoclonal antibody and external scintigraphy.

Science 206, 844-847 (1979)

Barnes, D., Sato, G.: Methods for growth of cultured cells in serum-free medium.

Anal. Biochem. 102, 255-270 (1980)

Benson, S., Olsnes, S., Phil, A., Skorve, J., Abraham, K.A.: On the mechanism of protein-synthesis inhibition by abrin and ricin. Inhibition of the GTP-hydrolysis site on the 60-S ribosomal subunit.

Europ. J. Biochem. 59, 573-580 (1975)

Berners-Price, S.J., Mirabelli, C.K., Johnson, R.K., Mattern, M.R., McCabe, F.L., Fauette, L.F., Sung, C., Mong, S.M., Sadler, P.J., Crooke, S.T.: In vivo antitumor activity and in vitro cytotoxic properties of bis(1,2-bis(diphenylphosphino)ethane)gold(I)chloride.

Cancer Res. 46, 5486-5493 (1986)

Bernhard, M.J., Foon, K.A., Oeltmann, T.N., Key, M.E.,
Hwang, K.M., Clark, G.C., Christensen, W.L., Hoyer,
L.C., Hanna, M.G., jr., Oldham, R.K.: Guinea pig line 10
hepatocarcinoma model: Characterization of monoclonal
antibody and in vivo effect of unconjugated antibody
and antibody conjugated to diphteria toxin A chain.
Cancer Res. 43, 4420-4428 (1983)

Bernstein, I., Nowinski, R.C.: Monoclonal antibody treatment
of transplanted and spontaneous murine leukemia.
In: Mitchell, M.S., Oettgen, H.F. (eds.) Hybridomas in
cancer diagnosis and treatment. Raven Press, New York
1982, 97-112

Bernstein, I.D., Nowinski, R.C., Tam, M.R., McMaster, B.,
Houston, L.L., Clark, E.A.: Monoclonal antibody therapy
of mouse leukemia.
In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.):
Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York 1980,
275-291

Bilzer, T., Stavrou, D., Dahme, E., Anzil, A.P.:
Cell-mediated immunresponse in rats immunized with
chemically modified syngeneic glioma cells. Monitoring
by in vivo parameters and in vitro immune cytotoxicity.
Anticancer Res. 2, 345-354 (1982)

Bilzer, T., Stavrou, D., Mellert, W.: Cell-mediated lysis of glioma cells directed by monoclonal antibodies.

Brit. J. Cancer 50, 563-564 (1984)

Bjorn, M.J., Larrick, J., Piatek, M., Wilson, K.J.: Characterization of translational inhibitors of *Phytolacca americana*.

Biochem. Biophys. Acta 790, 154-163 (1984)

Bjorn, M.J., Ring, D., Frankel, A.: Evaluation of monoclonal antibodies for the development of breast cancer immunotoxins.

Cancer Res. 45, 1214-1221 (1985)

Blythman, H.E., Casellas, P., Gros, O., Gros, P., Jansen, F.K., Paolucci, F., Pau, B., Vidal, H. : Immunotoxins: Hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumor cells.

Nature (Lond.) 290, 145-146 (1981)

Boman, B.M., Fathman, G.: Monoclonal antibodies. The next attempt at tumor immunotherapy.

Mayo Clin. Proc. 56, 641-644 (1981)

Bourdon, M.A., Wikstrand, C.J., Furthmayr, H., Matthews, T.J., Bigner, D.D.: Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody.

Cancer Res. 43, 2796-2805 (1983)

Brooks, W.H., Rozman, T.L. Cellular immune responsiveness in patients with primary intracranial tumors.

In: Thomas, D.G.T., Graham, D.I. (eds): Braintumors: Scientific brain, clinical investigation and current therapy, London Butterworth 1980

Bumol, T.F., Wang, Q.C., Reisfeld, R.A., Kaplan, N.O.: Monoclonal antibody and an antibody-toxin conjugate to a cell surface proteoglycan of melanoma cells suppress in vivo tumor growth.

Immunology 80, 529-533 (1983)

Burstein, S., Knapp, R.: Chemotherapy of murine ovarian carcinoma by methotrexate antibody conjugates.

J. Med. Chem. 20, 950-952 (1977)

Canevari, S., Orlandi, R., Ripamonti, M., Tagliabue, E., Aguanno, S., Miotti, S., Menard, S., Colnaghi, M.I.: Ricin A chain conjugated with monoclonal antibodies selectively killing human carcinoma cells in vitro.

J. Nat. Canc. Inst. 75, 831-838 (1985)

Carlsson, J., Drevin, D., Axen, R.: Proteinthiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate - a new heterobifunctional reagent.

Biochem. J. 173, 727-737 (1978)

Carrel, S., de Tribolet, N., Mach, J.P.: Expression of neuroektodermal antigens common to melanomas, gliomas and neuroblastomas.

Acta Neuropathol. (Berl.) 57, 158-164 (1982)

Collier, R.J., Kandel, J.: Structure and activity of diphteria toxin I. Thiol-dependent dissociation of a fraction of toxin into enzymatically active and inactive fragments.

J. Biol. Chem. 246, 1496-1503 (1971)

Cravioto, H.: Immunology of experimental brain tumors.

In: H. Waters (ed.) The handbook of cancer immunology, New York-London: Garland STPM Press 1978 329-363

de Muralt, B., de Tribolet, N., Diserens, A.C., Carrel, S., Mach, J.P.: Reactivity of antiglioma monoclonal antibodies for a large panel of cultured gliomas and other neuroectoderm derived tumors.

Anticancer Res. 3, 1-6 (1983)

Denkers, E.Y., Badger, C.C., Ledbetter, J.A., Bernstein, I.D.: Influence of antibody isotype on passive serotherapy of lymphoma.

J. Immunol. 135, 2183-2185 (1985)

Dexter, G.L., Spremulli, E.N., Fligiel, Z., Barbosa, J.A., Vogel, R., VanVoorhes, A., Calabresi, P.: Heterogeneity of cancer cells from a single colon carcinoma.

American J. Med. 71, 949-956 (1981)

Dippold, W.G., Knuth, A., Meyer zum Büschenfelde, K.H.: Inhibition of human melanoma cell growth in vitro by monoclonal anti-GD.-Ganglioside antibody.

Cancer Res. 44, 806-810 (1984)

Dippold, W.G., Lloyd, K.O., Li, L.T.C., Ikeda, H., Oettgen, H.F., Old, L.J.: Cell surface antigens of human malignant melanomas: Definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 77, 6114-6118 (1980)

Drazin, R., Kandel, J., Collier, R.J.: Structure and activity of diphtheria toxin II. Attack by trypsin at a specific site within the intact toxin molecule.

J. Biol. Chem. 246, 1504-1510 (1971)

Eiklid, K., Olsnes, S., Phil, A.: Entry of lethal dosis of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of Hela cells.

Exp. Cell Res. 126, 321-326 (1980)

Eisenbarth, G.S., Walsh, F.S., Nirenberg, M.: Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4913-4917 (1979)

Embleton, M.J., Byers, V.S., Lee, H.M., Scannon, P., Blackhall, N.W., Baldwin, R.W.: Sensitivity and selectivity of ricin toxin A chain-monoclonal antibody 791T/36 conjugates against human tumor cell lines.

Cancer Res. 46, 5524-5528 (1986)

Embleton, M.J., Gunn, B., Byers, V.S., Baldwin, R.W.: Antigens on naturally occurring animal and human tumors detected by monoclonal antibodies.

Transplant. Proc. 13, 1966-1969 (1981)

Embleton, M.J., Rowland, G.F., Simmonds, R.G., Jacobs, E., Marsden, C.H., Baldwin, R.W.: Selective cytotoxicity against human tumor cells by a vindesine-monoclonal antibody conjugate.

Brit. J. Cancer 47, 43-49 (1983)

Epenetos, A.A., Bodmer, W.F., Britton, K.E.: Radioimmuno-
detection of cancer.

Eur. J. Clin. Oncol. 18, 1221-1223 (1982a)

Epenetos, A.A., Nimmon, C.C., Arklie, J., Elliott, A.T.,
Hawkins, L.A., Knowles, R.W., Britton, K.E., Bodmer,
W.F.: Detection of human cancer in an animal model
using radiolabelled tumor-associated monoclonal
antibodies.

Brit. J. Cancer 46, 1-8 (1982c)

Fabre, J.W.: Differentiation antigens of the human central
nervous system: identification with monoclonal
antibodies and potential clinical value.

In: McMichael, A.J. (ed.) Monoclonal antibodies in
clinical medicine. Acad. Press, New York 1982

Farraci, R.P.: In vitro demonstration of altered anti-
genicity of metastases from a primary
methylcholanthrene-induced sarcoma.

Surgery 76, 469-473 (1974)

Farrands, P.A., Pimm, M.V., Embleton, M.J., Perkins, A.C.,
Hardy, J.D., Baldwin, R.W., Hardcastle, J.D.:
Radioimmuno-detection of human colorectal cancers by an
antitumor monoclonal antibody.

Lancet 1, 387-400 (1982)

Fazekas de St., Groth, S., Scheidegger, D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics.

J. Immunol. Meth. 35, 1-21 (1980)

Feit, C., Bartal, A.H., Tauber, G., Dymbort, G., Hirsaut, Y.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies recognizing surface antigens expressed on viable cells.

J. Immunol. Meth. 58, 301-308 (1983)

Fodstad, O., Johannessen, J.V., Schjerven, L., Pihl, A.: Toxicity of abrin and ricin in mice and dogs

J. Toxicol. Environ. Health 5, 1073-1084 (1979)

Fortmaier, H.: Thymusaplastische Maus (nu/nu), thymusaplastische Ratte (rnu/nu). Haltung, Zucht, Versuchsmodelle

Schriftenreihe Versuchstierkunde, Heft 8, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1981

Galfré, G., Milstein, C., Wright, B.: Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG.

Nature (Lond.) 227, 131-133 (1979)

Gallego, J., Price, M.R., Baldwin, R.W.: Preparation of four daunomycin-monoclonal antibody 791T/36 conjugates with anti-tumor activity.

Int. J. Cancer 33, 737-744 (1984)

Garnett, M.C., Embleton, M.J. Jacobs, E.: Preparation and properties of a drug-carrier-antibody conjugate showing selective antibody-directed cytotoxicicity in vitro.
Int. J. Cancer 31, 661-670 (1983)

Garrigues, H.J., Tilgen, W., Hellström, I., Hellström, K.E.: Detection of a human melanoma-associated antigen, p97, in histological section of primary human melanomas.
Int. J. Cancer 29, 511-515 (1982)

Gateley, M.K., Glaser, M., McCarron, E.M.: Mechanisms by which human gliomas may escape cellular immune attack.
Acta Neurochir. 64, 175-19 (1982)

Ghose, T., Guclu, A.: Cure of a mouse lymphoma with radio-ionated antibody.
Europ. J. Cancer 10, 787-792 (1974)

Ghose, T., Nigam, S.P.: Antibody as carrier of chlorambucil.
Cancer 29, 1398-1400 (1972a)

Ghose, T., Norvell, S.T., Guelu, A., Cameron, D., Bodurtha, A., MacDonald, A.S.: Immunotherapy of cancer with chlorambucil-carrying antibody.
Brit. Med. J. 3, 495-499 (1972b)

- Ghose, T., Ramakrishnan, S., Kulkarni, P., Blair, A.H.,
Vaughan, K., Nolido, H., Norvell, S.T., Belitsky, P.:
Use of antibodies against tumor-associated antigens for
cancer diagnosis and treatment.
Transplant. Proc. 13, 1970-1972 (1981)
- Gilliland, D.G., Steplewski, Z., Collier, R.J., Mitchell,
K.F., Chang, T.H., Koprowski, H.: Antibody-directed
cytotoxic agents: Use of monoclonal antibodies to
direct the action of toxin A chains to colorectal
carcinoma cells.
Biochemistry 77, 4539-4543 (1980)
- Greenberg, A.H., Lydyard, P.M.: Observations of IgG.
anti-DNP hybridoma-mediated ADCC and the failure of
three IgM anti-DNP hybridomas to mediate ADCC.
J Immunol. 132, 861-869 (1979)
- Hedin, A., Wahren, B., Hammarström, S.: Tumor localization
of CEA-containing human tumours in nude mice by means
of monoclonal anti-CEA-antibodies.
Int. J. Cancer 30, 547-552 (1982)
- Hellström, I., Brankovan, V., Hellström, K.E.: Strong anti-
tumor activities of IgG₃ antibodies to a human
melanoma-associated ganglioside.
Immunology 82, 1499-1502 (1985)

Hellström, I., Hellström, K.E. Evan, C.A., Heppner, G.H.,
Pierce, G.E., Yang, J.P.S.: Serum mediated protection
of neoplastic cells from inhibition by lymphocytes
immune to their tumor specific antigens.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 62, 362-368 (1969)

Hellström, I., Hellström, K.E., Pierce, G.E., Bill, A.H.:
Demonstration of cell-bound and humoral immunity
against neuroblastoma cells.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 60, 1231-1238 (1968)

Herbermann, R.B.: Immunogenicity of tumor antigens.

Biochem. Biophys. Acta 473, 93-119 (1977)

Herlyn, D., Herlyn, M., Steplewski, Z., Koprowski, H.: Mono-
clonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against
human melanoma and colorectal carcinoma.

Eur. J. Immunol. 9, 657-659 (1979)

Herlyn, D., Powe, J., Alavi, A., Mattis, J.A., Herlyn, M.,
Ernst, C., Vaum, R., Koprowski, H.:
Radioimmunodetection of human tumor xenografts by
monoclonal antibodies.

Cancer Res. 43, 2731-2736 (1983)

Herlyn, D.M., Steplewski, Z., Herlyn, M.F., Koprowski, H.:

Inhibition of growth of colcorectal carcinoma in nude mice by monoclonal antibody.

Cancer Res. 40, 717-721 (1980)

Herrmann, F., Kommischke, B., Sieber, G., Rühl, H.: Heterogeneity of T-cell neoplasias as defined by monoclonal antibodies.

Klin. Wochenschr. 61, 807-812 (1983)

Jansen, F.K., Blythman, H.E., Carriere, D., Casellas, P., Diaz, J., Gros, P., Hennequin, J.R., Paolucci, F., Pau, B., Poncelet, P., Richer, G., Salhi, S.L., Vidal, H., Voisin, G.A.: High specific cytotoxicity of antibody-toxin hybrid molecules (Immunotoxins) for target cells.

Immunol. Lett. 2, 97 (1980)

Jansen, F.K., Blythman, H.E., Carriere, D., Casellas, P., Gros, O., Gros, P., Laurent, J.C., Paolucci, F., Pau, B., Poncelet, P., Richer, G., Vidal, H., Voisin, G.A.: Immunotoxins: Hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity.

Immunol. Rev. 62, 185-216 (1982)

Jonak, Z.L.: Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation.

In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds)
Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York 1980,
405-406

Kavamoto, T., Sato, J.D., Le, A., Polikoff, J., Sato, G.,
Mendelsohn, J.: Growth stimulation of A431 cells by
epidermal growth factor: Identification of high
affinity receptors for epidermal growth factor by an
anti-receptor monoclonal antibody.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 80, 1337-1341 (1983)

Kanellos, J., Pietersz, G.A., McKenzie I.F.C.: Studies of
methotrexate-monoclonal antibody conjugates for immuno-
therapy.

J. Nat. Canc. Inst. 75, 319-332 (1985)

Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.: A
new mouse myeloma cell line that has lost
immunoglobulin expression but permits the construction
of antibody-secreting hybrid cell lines.

J. Immunol. 123, 1548-1550 (1979)

Kennel, S.J., Lankford, T., Flynn, K.M.: Therapy of a murine sarcoma using syngeneic monoclonal antibody.

Cancer Res. 43, 2843-2848 (1983)

Kennett, R.H., Gilbert, F.: Hybrid myelomas producing antibodies against human neuroblastoma antigen present on fetal brain.

Science 203, 1120-1121 (1979)

Kennett, R.H., Jonak, Z.L., Bechtol, K.B.: Monoclonal antibodies against human tumor-associated antigens.

In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.): Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York 1980, 155-167

Kishida, K., Masuho, Y., Saito, M., Hara, T., Fuji, H.: Ricin A-chain conjugated with monoclonal anti-L-1210 antibody. In vitro and in vivo antitumor activity.

Canc. Immunol. Immunother 16, 93-97 (1983)

Klein, G.: Tumor antigens.

Amer. Rev. Microbiol. 20, 223-252 (1966)

Köhler, G.: Immunoglobulin chain loss in hybridoma lines.

Immunology 77, 2197-2199 (1980)

Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature (Lond.) 256, 495-497 (1975)

Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D., Fuhrer, P.: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies.

Somatic Cell Molec. Genetics 5, 957-972 (1979)

Kornblith, P.L., Dohan, W.C., Whiteman, B.O.: Human astrocytoma: serum-mediated immunologic response.

Cancer 6, 1512-1519 (1974)

Krolick, K.A., Villemez, C., Isakson, P., Uhr, J.W., Vitetta, E.S.: Selective killing of normal or neoplastic B cells by antibodies coupled to the A chain of ricin.

Immunology 77, 5419-5423 (1980)

Laerum, O.D., Mork, S., Rajewsky, M.S., Hansteen, I.L., Haugen, A.: Heterogeneity and selection of neoplastic neurogenic rat cells in vivo and in vitro.

Anticancer Res. 3, 187-194 (1983)

Lederer, T., Stavrou, D., Mellert, W., Zänker, K.S.: Induction of surface changes, membrane traffic alteration and growth delay on rat glioma cells by a monoclonal antibody.

Brit. J. Cancer 50, 567-568 (1984)

Lemke, H., Hämmerling, G.J., Höhmann, C., Rajewsky, K.:

Hybrid cell lines secreting monoclonal antibody specific for major histocompatibility antigens of the mouse.

Nature (Lond.) 271, 249-251 (1978)

Libert, A., Ghanem, G., Arnold, R., Vercammen, A., Carrel,

S., Lejeune, F.: Monoclonal antibodies to human melanoma associated antigens: Study of their specificity and visualization at the cellular level of the antigenic distribution.

Anticancer Res. 3, 219-226 (1983)

Lindmo, T., Davies, C., Rofstad, E.K., Fodstad, O., Sundan,

A.: Antigen expression in human melanoma cells in relation to growth conditions and cell-cycle distribution.

Int. J. Cancer 33, 167-171 (1984)

Lingwood, C.A., Hakomori, S.: Selective inhibition of cell growth and associated changes in glycolipid metabolism induced by monoclonal antibodies to glycolipids.

Exp. Cell Res. 108, 385-391 (1977)

Mach, J.P., Buchegger, F., Forni, M., Ritschard, J., Berche, C., Lumbroso, J.D., Schreyer, M., Girardet, C., Accolla, R.S., Carrel, S.: Use of radiolabelled monoclonal anti-CEA antibodies for the detection of human carcinomas by external photoscanning and tomosciniography.

Immunol. Today 2, 239-249 (1981)

Masuho, Y., Hara, T.: Target-cell cytotoxicity of a hybrid of Fab of immunoglobulin and A chain of ricin.

GANN 71, 759-765 (1980)

Masuho, Y., Kishida, K., Saito, M., Umemoto, N., Hara, T.: Importance of the antigen-binding valency and the nature of the crosslinking band in ricin A chain conjugates with antibody.

J. Biochem. 91, 1583-1591 (1982)

Masui, H., Moroyama, T., Mendelsohn, J.: Mechanism of anti-tumor activity in mice for anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies with different isotypes.

Cancer Res. 46, 5592-5598 (1986)

Mattes, M.J., Cairncross, J.G., Old, L.J., Lloyd, K.O.: Monoclonal antibodies to three widely distributed human cell surface antigens.

Hybridoma 2, 253-264 (1983)

McKearn, T.J.: Method for growing hybridomas in rats or mice.

In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.)
Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York 1980, 403

Merriam, J.C.: Toxicity of a monoclonal F(ab')₂ ricin A chain conjugate for retinoblastoma in vitro.

Cancer Res. 44, 3178-3183 (1984)

Minna, J.D., Cuttitta, F., Rosen, S., Bunn, P.A., Carney, D.N., Gazdar, A.F., Krasnow, S.: Methods for production of monoclonal antibodies with specificity for human lung cancer cells.

In Vitro 17, 1058-1070 (1981)

Mitchell, K.F., Fuhrer, J.P., Steplewski, Z., Koprowski, H.: Structural characterization of the "melanoma-specific" antigen detected by monoclonal antibody 691INu-4-B.

Mol. Immunol. 18, 207-218 (1981)

Miyazaki, H., Beppu, M., Terao, T., Osawa, T.: Preparation of anti (IgG)-ricin A chain conjugate and its biologic activity.

GANN 71, 766-774 (1980)

Moolten, F., Zajdel, S., Cooperband, S.: Immunotherapy of experimental animal tumors with antitumor antibodies conjugated to diphtheria toxin or ricin.

Ann. New York Acad. Sci. 277, 690-699 (1976)

Motta, R.: Passive immunotherapy of leukemia and other cancer.

Adv. Cancer Res. 14, 161-179 (1971)

Nadler, L.M., Stashenko, P., Hardy, R., Kaplan, W.D., Button, L.N., Kufe, W., Antman, K.H., Schlossman, S.F.: Serotherapy of a patient with monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen.

Cancer Res. 40, 3147-3154 (1980)

Natali, P.G., Viora, :, Nicotra, M.R., Giacomini, P., Bigotti, A., Ferrone, S.: Antigenic heterogeneity of skin tumors of nonmelanocyte origin: analysis with monoclonal antibodies to tumor-associated antigens and to histocompatibility antigens.

J. Nat. Canc. Inst. 71, 439-447 (1983)

Neuberger, M.S., Gareth, T.W., Fox, R.O.: Recombinant antibodies possessing novel effector functions.

Nature (Lond.) 312, 604-608 (1984)

Nexø, B.A.: A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme-coupled antibodies.

Virology 77, 849-852 (1977)

North, S.M., Dean, C.J.: Monoclonal antibodies to rat sarcoma.

Immunology 49, 667-671 (1983)

North, S.M., Styles, J.M., Hobbs, S.M., Dean, C.J.:
Monoclonal antibodies to rat sarcoma I.

Immunology 47, 397-405 (1982)

Old, L.J., Boyse, E.A.: Immunology of experimental tumors.

Amer. Rev. Med. 15, 167-186 (1969)

Olsnes, S.: Directing toxins to cancer cells.

Nature (Lond.) 290, 84 (1981)

Olsnes, S., Phil, A.: Different biological properties of two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis.

Biochem. 12, 3121-3126 (1973)

Pateraki, E., Guesdon, J.L., Serie, C., Avrameas, S.:

TERELISA: the ELISA test performed in Terasaki plates.

J. Immunol. Meth. 46, 361-36 (1981)

Phillips, J., Alderson, T., Sikora, K., Watson, J.:

Localization of malignant glioma by radiolabelled human monoclonal antibody.

J. Neurol. Psych. 46, 388-392 (1983)

Pimm, M.V., Embleton, M.J., Perkins, A.C., Price, M.R.,

Robins, R.A., Robinson, G.R., Baldwin, R.W.: In vivo localization of anti-osteogenic sarkoma 791T monoclonal antibody in osteogenic sarkoma xenografts.

Int. J. Cancer 30, 75-85 (1982)

Press, W.O.: Evaluation of ricin A chain immunotoxis directed against human T-cells.

Cell. Immunol. 102, 10-20 (1986)

Raso, V., Ritz, J., Basala, M., Schlossman, S.F.: Monoclonal antibody-ricin A-chain conjugate selectively cytotoxic for cells bearing the common acute lymphoblastic leukemia antigen.

Cancer Res. 42, 457 (1982)

Rector, E.S., Schwenk, R.J., Tse, K.S., Schon, A.H.: A method for preparation of protein-protein conjugates of predetermined composition.

J. Immunol. Meth. 24, 321-326 (1978)

Rowland, G.F., Axton, C.A., Baldwin, R.W., Brown, J.P.,
Corvalan, I.R.F., Embleton, M.J., Gore, V.A.,
Hellström, I., Hellström, K.E., Jacobs, E., Marsden,
C.H., Pimm, M.V., Simmonds, R.G., Smith, W.: Antitumor
properties of vindesine-monoclonal antibody conjugates.
Cancer Immunol. Immunother 19, 1-7 (1985)

Scheinberg, D.A., Strand, M., Gansow, O.A.: Tumor imaging
with radioactive metal chelates conjugated to
monoclonal antibodies.
Science 215, 1511-1513 (1982)

Schimmelpfeng, L., Langenberg, U., Peters, H.: Macrophages
overcome mycoplasma infections of cells in vitro.
Nature (Lond.) 285, 661-662 (1980)

Schnegg, J.F., Diserens, A.C., Carrel, S., Accolla, R.S., de
Tribolet, N.: Human glioma-associated antigens detected
by monoclonal antibodies.
Cancer Res. 41, 1209-1213 (1981)

Schroff, R.W., Woodhouse, C.S., Foon, K.A., Oldham, R.K.,
Farrell, M.M., Klein, R., Morgan, A.C., jr.: Intratumor
localization of monoclonal antibody in patients with
melanoma treated with antibody to a 250.000 Dalton
melanoma-associated antigen.

J. Nat. Canc. Inst. 74, 299-306 (1985)

Seeger, R.C., Rosenblatt, H.M., Imai, K., Ferrone, S.:
Common antigenic determinants on human melanoma,
glioma, neuroblastoma and sarcoma cells defined with
monoclonal antibodies.

Cancer Res. 41, 2714-2717 (1981)

Seon, B.K.: Specific killing of human leukemia cells by
immunotoxins prepared with ricin A chain and monoclonal
anti-human T-cell leukemia antibodies.

Cancer Res. 44, 259-264 (1984)

Seto, M., Takahashi, T., Nakamura, S., Matsudaira, Y.,
Nishizuka, Y.: In vivo antitumor effects of monoclonal
antibodies with different immunoglobulin classes.

Cancer Res. 43, 4768-4773 (1983)

Sikora, K., Alderson, T.: Human hybridomas from malignant
gliomas.

Lancet 2, 11-14 (1982)

Sikora, K., Phillips, J.: Human monoclonal antibodies to glioma cells.

Brit. J. Cancer 43, 105-107 (1981)

Stanworth, D.R., Turner, M.W.: Immunochemical analysis of immunoglobulins and their specific subunits.

In: Weir, D.M. (ed.) Handbook of experimental immunology , Blackwell Scientific Publications 1976

Stavrou, D., Anzil, A.P., Elling, H.: Tumor specific fluorescent and complement-dependent cytotoxic antibodies in the serum of rats with chemically induced brain gliomas.

Acta Neuropathol. (Berl.) 43, 111-117 (1978a)

Stavrou, D., Elling, H., Haglid, K.G.: Demonstration of humoral antibodies against autologous cells in experimental rabbit gliomas.

J. Neuropath. Exp. Neurol. 37, 694 (1978b)

Stavrou, D., Hulten, M., Anzil, A.P., Bilzer, T.: The humoral antibody response of rats immunized with chemically modified syngeneic brain cells and glioma cells.

Int. J. Cancer 26, 629-637 (1980)

Stavrou, D., Mellert, W., Bilzer, T.: Monoclonal antibody treatment of cultivated glioma cells.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 107, 27 (1984)

Stavrou, D., Mellert, W., Bilzer, T., Senekowitsch, R.,
Keiditsch, E., Mehraein, P.: Radioimmunodetection of
gliomas by administration of radiolabelled monoclonal
antibodies. Experimental data.

Anticancer Res. 5, 147-156 (1985a)

Stavrou, D., Mellert, W., Bilzer, T., Senekowitsch, R.,
Keiditsch, E., Mehraein, P.: Localization of
experimental glioma grafts by means of iodinated
monoclonal antibodies and radionuclide imaging.

Acta Neuropathol. (Berl.) 66, 340-342 (1985b)

Stavrou, D., Mellert, W., Mellert, U., Keiditsch, K., Bise,
K., Mehraein, P.: Growth inhibition of experimental
glioma grafts by monoclonal antibody treatment.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 112, 111-118 (1986)

Stavrou, D., Süß, C.: Hybridomas producing monoclonal
antibodies against chemically induced gliomas.

J. Neuroimmunol. 3, 241 (1982)

Stavrou, D., Süß, C., Bilzer, T., Kummer, U., de Tribolet,
N.: Monoclonal antibodies reactive with glioma cell
lines derived from experimental brain tumors.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 1439-1449 (1983)

- Strand, M., Scheinberg, D.A., Gansow, O.A.: Monoclonal antibody conjugates for tumor imaging and therapy.
In: Beers, R.F. (ed.) Gene transfer and transformation
Raven Press, New York 1984, 385-393
- Steplewski, Z., Herlyn, D., Maul, G., Koprowski, H.:
Hypothesis: Macrophages as effector cells for human tumor destruction mediated by monoclonal antibody.
Hybridoma 2, 1-5 (1983)
- Thomas, D.G.T., Lannigan, C.B., Behan, P.O.: Impaired cell-mediated immunity in human brain tumors.
Lancet 1, 1389 (1975)
- Thomas, L.: Poly- und monoklonale Antikörper: Herstellung und Bedeutung für die medizinische Diagnostik.
Lab. Med. 8, 225-231 (1984)
- Thorpe, P.E., Ross, W.C.J.: The preparation and cytotoxic properties of antibody-toxin conjugates.
Immunol. Rev. 62, 119-158 (1982)
- Tsukazaki, K., Hayman, E.G., Ruoslahti, E.: Effects of ricin-A-chain conjugates of monoclonal antibodies to human a-fetoprotein and placental alkaline phosphatase on antigen- producing tumor cells in culture.
Cancer Res. 45, 1834-1838 (1985)

Villemez, C.L., Carlo, P.L.: Preparation of an immunotoxin
for *Acanthamoeba castellanii*.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 25-29 (1984)

Vitetta, E., Krolick, K.A., Miyama-Inaba, M., Cushley, W.,
Uhr, J.W.: Immunotoxins: A new approach to cancer
therapy.

Science 219, 644-650 (1983a)

Vitetta, E., Cushley, W., Uhr, J.W.: Synergy of ricin A
chain-containing immunotoxins and ricin B
chain-containing immunotoxins in vitro killing of
neoplastic human B cells.

Immunology 80, 6332-6335 (1983b)

Vitetta, E., Krolick, K.A., Uhr, J.W.: Neoplastic B cells as
targets for antibody-ricin A chain immunotoxins.

Immunol. Rev. 62, 158-183 (1982)

Vollmers, H.P., Birchmeier, W.: Monoclonal antibodies
inhibit the adhesion of mouse B 16 melanoma cells in
vitro and block lung metastasis in vivo.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 80, 3729-3733 (1983)

Wahlström, T., Linder, E., Saksela, E., Westermark, E.:
Tumor-specific membrane antigens in established cell
lines from gliomas.

Cancer 34, 274-279 (1974)

Warnatz, H.: Tumorimmunologie

Thieme, Stuttgart (1975)

Weij, J.P., van der Veen, C., de Vries, E., Cats, A.: The use of a peroxidase-anti-peroxidase complex for the visualization of monoclonal antibodies on the ultra-structural level.

Clin. Exp. Immunol. 54, 819-826 (1983)

Weinstein, J.N., Parker, R.J., Keenan, A.M., Dower, S.K., Morce, H.C., Sieber, S.M.: Monoclonal antibodies in lymphatics: Toward the diagnosis and therapy of tumor metastasis.

Science 218, 1334-1337 (1982)

Weinstein, J.N., Steller, M.A., Keenan, A.M., Covell, D.G., Key, M.E., Sieber, S.M., Oldham, R.K., Hwang, K.M., Parker, R.J.: Monoclonal antibodies in lymphatics: Selective delivery to lymph node metastases or a solid tumor.

Science 222, 423-426 (1983)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.: Expression of a human fetal brain antigen by human tumors of neuroectodermal origin as defined by monoclonal antibodies.

Cancer Res. 39, 3215-3243 (1982)

Wikstrand, C.J., Bigner, S.H., Bigner, D.D.: Demonstration of complex antigenic heterogeneity in a human glioma cell line and eight derived clones by specific monoclonal antibodies.

Cancer Res. 43, 3327-3334 (1983)

Wikstrand, C.J., Mahaley, M.S., Bigner, D.D.: Surface antigenic characteristic of human glial brain tumor cells.

Cancer Res. 37, 4267-4275 (1977)

Yeh, M.Y., Hellström, I., Hellström, K.E.: Clonal variation in expression of a human melanoma antigen defined by a monoclonal antibody.

J. Immunol. 126, 1312-1317 (1981)

Yeh, M.J., Hellström, I., Brown, J.P., Warner, G.H., Hansen, J.A., Hellström, K.E.: Cell surface antigen of a human melanoma identified by monoclonal antibody.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 2927-2931 (1979)

Youle, R.J., Neville, D.M., jr.: Anti-Thy 1.2 monoclonal antibody linked to ricin is a potent cell-type specific toxin.

Med. Sciences 77, 5483-5486 (1980)

Zalcberg, J.R., Thompson, C.H., Lichtenstein, M., McKenzie,
J.F.C.: Tumor immunotherapy in the mouse with the use
of ¹³¹I-labeled monoclonal antibodies.
J. Nat. Canc. Inst. 72, 697-704 (1984)

Herrn Prof. Dr. Dr. D. Stavrou danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Frau D. Wallmann danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente sowie Frau A. Lechner für ihre technische Hilfeleistung.

Mein Dank gilt auch meinem Mann, der mir bei der Durchführung der Experimente und der schriftlichen Abfassung dieser Arbeit eine wertvolle Hilfe war.

Auch allen Ungenannten, die mir in verschiedenster Weise beim Gelingen der Dissertation halfen, möchte ich an dieser Stelle danken.

Lebenslauf

- 1955 geboren am 18. Juli in Saarbrücken
Vater: Paul Süß, Kaufmann
Mutter: Gertrud Süß, geb. Burbach
- 1962-1966 Besuch der evang. Volksschule in Saarbrücken-St. Arnual
- 1966-1975 Besuch des staatlichen Gymnasiums am Rotenbühl in Saarbrücken
- 1975 20. Mai Reifezeugnis
- 1975-1976 Physikstudium an der Universität des Saarlandes
- 1977-1979 Ausbildung zur veterinärmedizinisch-technischen Assistentin an der tierärztlichen Hochschule Hannover
Abschluß der Ausbildung am 28. September 1979
- 1981 1. April - 30. September Anstellung als vet.med.-techn. Assistentin in Tierklinik Knaup, Ettleben.
- 1981-1986 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1984 5. Oktober Eheschließung mit Werner Mellert, Tierarzt.
1. November Beginn der Dissertation am Institut für Tierpathologie, Abteilung funktionelle Pathologie (Prof. Dr. Dr. D. Stavrou) der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1987 20. März Approbation als Tierärztin

